

Taíse Tognon

**USO DA MICROSCOPIA DIGITAL PARA COMPARAÇÃO DE
ESPESSURA ENTRE CÓRNEAS NORMAIS E REJEITADAS *EX-VIVO*:
ÊNFASE NA MEMBRANA DE *DESCEMET***

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Doutora em Oftalmologia e Ciências
Visuais.

São Paulo
2019

Táise Tognon

**USO DA MICROSCOPIA DIGITAL PARA COMPARAÇÃO DE
ESPESSURA ENTRE CÓRNEAS NORMAIS E REJEITADAS *EX-VIVO*:
ÊNFASE NA MEMBRANA DE *DESCEMET***

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutora em Oftalmologia e Ciências Visuais.

Orientador:

Prof. Dr. Miguel N. N. Burnier Jr.

Co-orientadores:

Prof. Dra. Luciene Barbosa de Sousa

Prof. Dr. Mauro Campos

São Paulo

2019

Tognon, Taíse

Uso da microscopia digital para comparação de espessura entre córneas normais e rejeitadas *ex-vivo*: ênfase na membrana de *Descemet* / Taíse Tognon.

-- São Paulo, 2019.

xiv, 65f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia.

Título em inglês: The use of digital microscopy method for comparison of thicknesses between normal corneas and *ex vivo* rejected corneal grafts: focus on *Descemet* membrane

1. Patologia 2. Histologia 3. Córnea 4. Rejeição de Enxerto
5. Microscopia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM OFTALMOLOGIA E CIÊNCIAS VISUAIS

Chefe do departamento: Prof. Dr. Mauro Campos

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Augusto Paranhos Jr.

Táise Tognon

**USO DA MICROSCOPIA DIGITAL PARA COMPARAÇÃO DE
ESPESSURA ENTRE CÓRNEAS NORMAIS E REJEITADAS *EX-VIVO*:
ÊNFASE NA MEMBRANA DE *DESCEMET***

Presidente da banca:

Prof. Dr. Miguel N. N. Burnier Jr.

Banca examinadora - titulares:

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Banca examinadora - suplentes:

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Dedicatória

*“A paixão torna-se uma força quando encontra saída no trabalho dos nossos braços,
na perícia das nossas mãos ou na atividade criadora do nosso espírito.”*

George Eliot

A Kleyton Barella – por dividir comigo não só as aptidões, mas o lar e o coração.

A Ivanir, Lurdes e Daniel – por me ensinarem o respeito, a perseverança, a disciplina
e o cuidado. Família é a primeira personificação do amor.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Miguel N. N. Burnier Jr., por acolher e viabilizar tantos sonhos e sempre acreditar no nosso potencial, por receber com carinho os alunos no Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory e na McGill University. Seu tempo, sua orientação e seus conselhos são especiais e valiosos.

À Tiffany Porraccio, profissional competente e encantadora, que organizou com precisão cada passo da execução deste trabalho e me encontrou todas as manhãs com um enorme sorriso.

A Ma. Christina Mastromonaco, que me ajudou em todas as etapas da pesquisa e festejou cada missão cumprida, além de ser presença constante com seu bom-humor e sua querida companhia.

A Ma. Sabrina Bergeron, que pacientemente me ensinou como manipular cada aparelho e abdicou de seus afazeres em favor dos meus. Sua ajuda foi fundamental na execução desta tese, e suas risadas me fizeram sentir em casa.

À Ana Beatriz de Toledo Dias, que cuidadosamente me auxiliou no preparo e seleção dos casos e à Laura Nunez e ao Francisco Murta, que foram os precursores desta pesquisa.

Aos Professores Dra. Luciene Barbosa de Sousa e Dr. Mauro Campos, por serem uma inspiração e estarem sempre dispostos a me guiar e escutar.

Ao Prof. Dr. Adriano Pasqualotti, cujas lições não são somente sobre estatística, mas sobre altruísmo, empatia e dedicação.

Um especial agradecimento aos Professores Dra. Elvira Barbosa Abreu e Dr. Manoel Abreu (*in memoriam*), sábios mestres, por me ensinarem as primeiras lições oftalmológicas e despertar minha paixão pelo ensino. Ainda, agradeço a todo o corpo clínico do Instituto Penido Burnier, por me aceitarem primeiramente como aprendiz e posteriormente como colega.

Aos residentes, estagiários, funcionários e colaboradores da Fundação Dr. João Penido Burnier, pelo constante incentivo ao aprendizado.

Aos pacientes, razão de minha incessante busca pela perfeição e sabedoria.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de símbolos e abreviaturas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A córnea humana	3
2.1.1 Epitélio	5
2.1.2 Camada de <i>Bowman</i>	6
2.1.3 Estroma ou substância própria	6
2.1.4 Membrana de <i>Descemet</i> ou de <i>Demours</i>	7
2.1.5 Endotélio	12
2.2 Transplante corneano e rejeição	13
2.3 Preparo histológico de tecidos	15
2.4 Histopatologia e microscopia digital	17
2.5 <i>Scanners</i> digitais	20
3 OBJETIVO	23
4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Tipo de estudo	24
4.2 Considerações éticas	24
4.3 Amostras em estudo	24
4.4 Método	25
4.4.1 Preparo histológico	25
4.4.2 Escaneamento e digitalização das lâminas	27
4.4.3 Aferição das medidas das camadas corneanas	29
4.4.4 Comparação das aferições exclusivamente manual e através da microscopia digital	32
4.5 Compilação dos dados	33

4.6 Análise estatística	34
5 RESULTADOS.....	35
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	48
8 REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS	
Bibliografia Consultada	

Lista de figuras

Figura 1.	Aspecto histológico das camadas corneanas em humanos, coloração ácido periódico de <i>Schiff</i> (PAS), aumento microscópico de 20x.....	4
Figura 2.	Representação esquemática da camada epitelial corneana em humanos.....	5
Figura 3.	Configuração das lamelas de colágeno e dos ceratócitos no estroma corneano em humanos.....	7
Figura 4.	Membrana de <i>Descemet</i> primitiva, em um feto humano de 61 mm (aproximadamente 12 semanas gestacionais), aumento de 650x.....	9
Figura 5.	Membrana de <i>Descemet</i> (círculo) e suas regiões anterior estriada (A) e posterior não-estriada (B), coloração PAS, aumento de 40x.....	10
Figura 6.	Micrografia de transmissão eletrônica demonstrando a interface do estroma posterior e da membrana de <i>Descemet</i> (MD) em humanos.....	11
Figura 7.	Micrografias de transmissão eletrônica demonstrando a variação de distância dos ceratócitos estromais (C) da membrana de <i>Descemet</i> (MD) em humanos.....	12
Figura 8.	Representação esquemática da região posterior corneana em humanos.....	12
Figura 9.	Comparação entre o fluxo da patologia digital e tradicional.....	21
Figura 10.	Padrões de escaneamento dos <i>scanners</i> digitais.....	22
Figura 11.	Amostras de blocos de parafina utilizados no estudo.....	26
Figura 12.	Aparelho Thermo Shandon Finesse® 325 utilizado para microtomia.....	26
Figura 13.	Leica ST5020®, sistema automatizado de coloração das lâminas histológicas.....	27
Figura 14.	Exemplares de lâminas coradas com ácido periódico de <i>Schiff</i> (PAS).....	27

Figura 15.	<i>Scanner</i> para digitalização de lâminas Philips Ultra Fast Scanner®	28
Figura 16.	Cassete utilizado para inserção das lâminas no <i>scanner</i> ...	28
Figura 17.	Interface do usuário no sistema operacional/ <i>software</i> do Philips Ultra Fast Scanner®	29
Figura 18.	Destaque para ferramenta utilizada nas aferições e medidas da imagem de uma lâmina	30
Figura 19.	Desenho esquemático dos referenciais utilizados para aferição das medidas corneanas utilizando <i>software</i> de microscopia digital.....	30
Figura 20.	Detalhes da técnica de aferição das medidas do epitélio corneano em lâmina corada com HE, magnificação 40x....	31
Figura 21.	Demonstração das aferições nas amostras corneanas, coloração HE, magnificação 20x.....	32
Figura 22.	Microscópio óptico marca Olympus EX41® utilizado para microscopia exclusivamente manual.....	32
Figura 23.	Medidas da membrana de <i>Descemet</i> em lâmina corada com HE, ênfase na exatidão da ferramenta utilizada, aumento 40x.....	38

Lista de tabelas

Tabela 1.	Especificações técnicas do Philips Ultra Fast Scanner [®] , de acordo com o fabricante.....	28
Tabela 2.	Comparação da idade, lateralidade e medidas das camadas obtidas por microscopia digital entre córneas normais e córneas de enxertos apresentando falência por rejeição.....	37
Tabela 3.	Comparação das médias das espessuras da membrana de <i>Descemet</i> obtidas por microscopia digital nas diferentes regiões de córneas normais e córneas de enxertos apresentando falência por rejeição	37
Tabela 4.	Comparação entre as medidas corneanas obtidas de microscopia exclusivamente manual e digital em 10 córneas normais, lâminas coradas com ácido periódico de <i>Schiff</i> (PAS)	39
Tabela 5.	Comparação entre as medidas obtidas de microscopia exclusivamente manual e digital em 10 enxertos apresentado falência por rejeição, lâminas coradas com ácido periódico de <i>Schiff</i> (PAS).....	40

Lista de símbolos e abreviaturas

%	Por cento
±	Mais ou menos
μm	Micra ou micrômetro
<	Menor
=	Igual
®	Marca registrada
a.C.	Antes de Cristo
DM	<i>Descemet membrane</i> , do inglês membrana de <i>Descemet</i>
DP	Desvio padrão
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
EFR	Enxertos apresentando falência por rejeição
EUA	Estados Unidos da América
FGR/FGRs	<i>Failed graft(s) due to rejection</i> , do inglês enxerto(s) apresentando falência por rejeição
HE	Hematoxilina-eosina
HR-OCT	Tomografia de coerência óptica de alta resolução
Inc.	Incorporadora
Kg	Quilogramas
MD	Membrana de <i>Descemet</i>
mm	Milímetro ou milímetros
n	Número de casos
nm	Nanômetros
°	Graus
°C	Graus Celsius
<i>p</i>	Probabilidade
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i> , do inglês ácido periódico de <i>Schiff</i>
Prof.	Professor
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
x	Vezes
β	Beta

Resumo

Objetivo: Analisar e comparar as medidas de espessura das camadas corneanas, especialmente a membrana de *Descemet* (MD), em córneas normais e provenientes de enxertos apresentando falência por rejeição (EFR) através do método de microscopia digital. **Métodos:** Estudo experimental, transversal e analítico, realizado no laboratório de patologia ocular Henry C. Witelson (McGill University Health Centre and Research Institute/Canadá). Foram examinadas lâminas de 25 córneas humanas normais e 40 provenientes de EFR utilizando *scanner* e *software* Philips Ultra Fast Scanner[®]. Os critérios de inclusão adotados foram amostras diagnosticadas como córneas normais ou EFR e advindos de pacientes acima dos 18 anos de idade. Foram excluídas da pesquisa as lâminas cujas estruturas corneanas não pudessem ser visibilizadas de forma adequada e/ou cujas informações epidemiológicas do doador não pudessem ser obtidas. De cada lâmina foram aferidas as espessuras das camadas corneanas, sendo realizadas 2 medidas centrais, 2 medidas na periferia nasal e 2 medidas na periferia temporal, utilizando planos perpendiculares como referência. **Resultados:** Houve diferença entre os grupos normais e com EFR nas médias da espessura central do epitélio ($p<0,001$), na região estromal nasal e temporal ($p<0,001$) e na MD nas regiões nasal e temporal ($p<0,001$). Quando efetuada comparação entre a média da espessura das diferentes regiões (central, nasal e temporal) da MD entre um mesmo grupo, nas córneas normais a região central da MD apresenta média de espessura mais fina em relação às duas regiões periféricas ($p<0,001$), diferença esta que não se verifica no grupo de EFR. **Conclusões:** Córneas normais apresentavam medidas de espessura centrais epiteliais menores em relação ao grupo EFR. Ainda, nas córneas normais as espessuras do estroma e MD da periferia nasal e temporal eram significativamente maiores em comparação com o grupo EFR.

Abstract

Objective: To analyze and compare thickness measurements of corneal layers, especially the *Descemet* membrane (DM), in normal corneas and in failed grafts due to rejection (FGRs) using a digital microscopy method. **Methods:** An experimental, cross-sectional, and analytical study was performed at the Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory (McGill University Health Center and Research Institute, Montreal/Canada). Slides of 25 normal human corneas and 40 FGRs were examined using a Philips Ultra Fast Scanner® and the associated software. The inclusion criteria adopted were samples diagnosed as normal corneas or FGRs, all specimens were from patients older than 18 years of age. Slides with corneal structures that could not be adequately visualized and/or whose donor epidemiological information could not be obtained were excluded from the study. On each slide, the thickness of the corneal layers was measured, with 2 central measurements, 2 measurements at the nasal periphery, and 2 measurements at the temporal periphery using perpendicular planes as reference. **Results:** There were differences between the normal and FGR groups in the means of the central thickness of the epithelium ($p<0.001$), the nasal and temporal stroma regions ($p<0.001$), and the DM in the nasal and temporal regions ($p<0.001$). Comparing the mean thicknesses of the different regions (central, nasal and temporal) of the DM in the same group, the central region of the DM in the normal corneas had a lower mean thickness than the two peripheral regions ($p<0.001$), a difference that did not occur in the FGR group. **Conclusions:** Normal corneas had a lower epithelium thickness in the central region than did corneas in the FGR group. In addition, the stroma and DM thickness of the nasal and temporal periphery was significantly higher in normal corneas than in those from the FGR group.

INTRODUÇÃO

O transplante pode ser descrito como o processo de retirada de células, tecidos ou órgãos de um indivíduo ou sítio e sua inserção em outro. Sendo a córnea avascular em condições normais, representando um sítio imunologicamente privilegiado, desde tempos remotos é alvo de procedimentos cirúrgicos e tentativas de enxertias com o objetivo de restaurar a visão. As técnicas cirúrgicas contemporâneas de transplante corneano culminaram de inúmeras ideias, experimentações e perseverança ao longo dos séculos⁽¹⁾.

A principal causa de insucesso descrita nos transplantes corneanos é a rejeição. Estudos demonstram que pelo menos 30% dos olhos com transplantes (ceratoplastias) penetrantes experimentaram pelo menos um episódio durante a vida e aproximadamente 5-7% destas rejeições conduziram a uma eventual falência⁽²⁻⁵⁾. A rejeição de um transplante corneano depende de uma série de fatores: seleção pré-operatória dos casos, medidas do botão doador e proximidade com o limbo e vasos, desempenho intra-operatório, detecção precoce e classificação, além do manejo adequado desde a retirada do botão doador até o pós-operatório tardio^(2, 6-8). As reações imunológicas que envolvem os transplantes vêm sendo intensamente estudadas no último século⁽⁵⁹⁾, porém ainda restam muitas dúvidas sobre esse assunto.

Ser capaz de prever ou realizar um diagnóstico precoce de rejeição e/ou falência de enxertos corneanos tem sido um desafio para vários pesquisadores. A detecção precoce de rejeição e falência pode, no futuro, impedir que estes botões sofram injúrias imunomediadas através de tratamentos modernos e minimamente invasivos.

Estudos histológicos em botões rejeitados têm demonstrado ceratócitos ativados que refletem inflamação intraestromal⁽⁹⁻¹¹⁾. Assim, surgiram hipóteses de que a rejeição pode ser detectada antes dos seus sinais clínicos, prevenindo a falência tecidual, utilizando técnicas microscópicas confocais *in vivo*^(12, 13).

Com o advento da tomografia de coerência óptica e de novos tomógrafos de alta definição, alguns autores investigaram métodos para detecção precoce de rejeição e/ou falência, iniciando as análises pormenorizadas da espessura corneana⁽¹⁴⁻¹⁹⁾.

Contudo, para que o desenvolvimento de ferramentas para detecção e intervenção precoce nestes casos seja factível, é preciso que os instrumentos utilizados tenham resolução adequada e suficiente e que as medições sejam padronizadas.

Não somente as cirurgias de transplante, o conceito de rejeição e as suas ferramentas de detecção têm experimentado avanços, mas também as análises histopatológicas. Assim, nos últimos anos, tecnologias digitais de imagem têm revolucionado a prática da medicina através do advento de *scanners*, processadores e digitalização de lâminas ou *slides*^(20, 21). Estes instrumentos têm removido as barreiras que os estudos tradicionais em lâminas de vidro apresentam, permitindo aos pesquisadores entenderem não somente as diferentes magnificações e imagens panorâmicas necessárias ao estudo médico, mas adquirir mais fidelidade nas informações durante o processo interpretativo⁽²⁰⁾. O uso de *scanners* digitais têm se tornando rotina na histologia, com aplicações na educação e telemedicina, permitindo análises por múltiplos profissionais⁽²⁰⁾.

Em tempo, com a crescente subespecialização em patologia cirúrgica, é de interesse encontrar novos limiares de competência e novas tecnologias, como a microscopia digital, têm este potencial de aperfeiçoamento em histopatologia⁽²²⁾. O recente desenvolvimento de *slides* virtuais e sua aceitação como um substituto para a microscopia óptica convencional em programas educacionais e de pesquisa encoraja o uso inovador destas ferramentas de avaliação⁽²²⁻²⁴⁾.

Assim, esta pesquisa tem como objetivo aferir através de ferramentas histopatológicas digitais a espessura das camadas corneanas, em especial da membrana de *Descemet*, em córneas normais e córneas de enxertos apresentando falência devido à rejeição. Esta camada foi escolhida para destaque devido às contundentes evidências sobre espessamento das membranas basais em transplantes alógenos de órgãos sólidos (principalmente rins) e sua correlação com os processos de rejeição e falência^(16, 25-28). Também objetiva-se estabelecer um protocolo de aferição das camadas corneanas utilizando a microscopia digital.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A córnea humana

A córnea consiste em uma estrutura avascular, transparente, responsável por parte importante do poder refrativo do globo ocular^(29, 30). Forma a camada mais externa na parte anterior do olho, correspondendo a 1/6 da sua circunferência⁽³¹⁾.

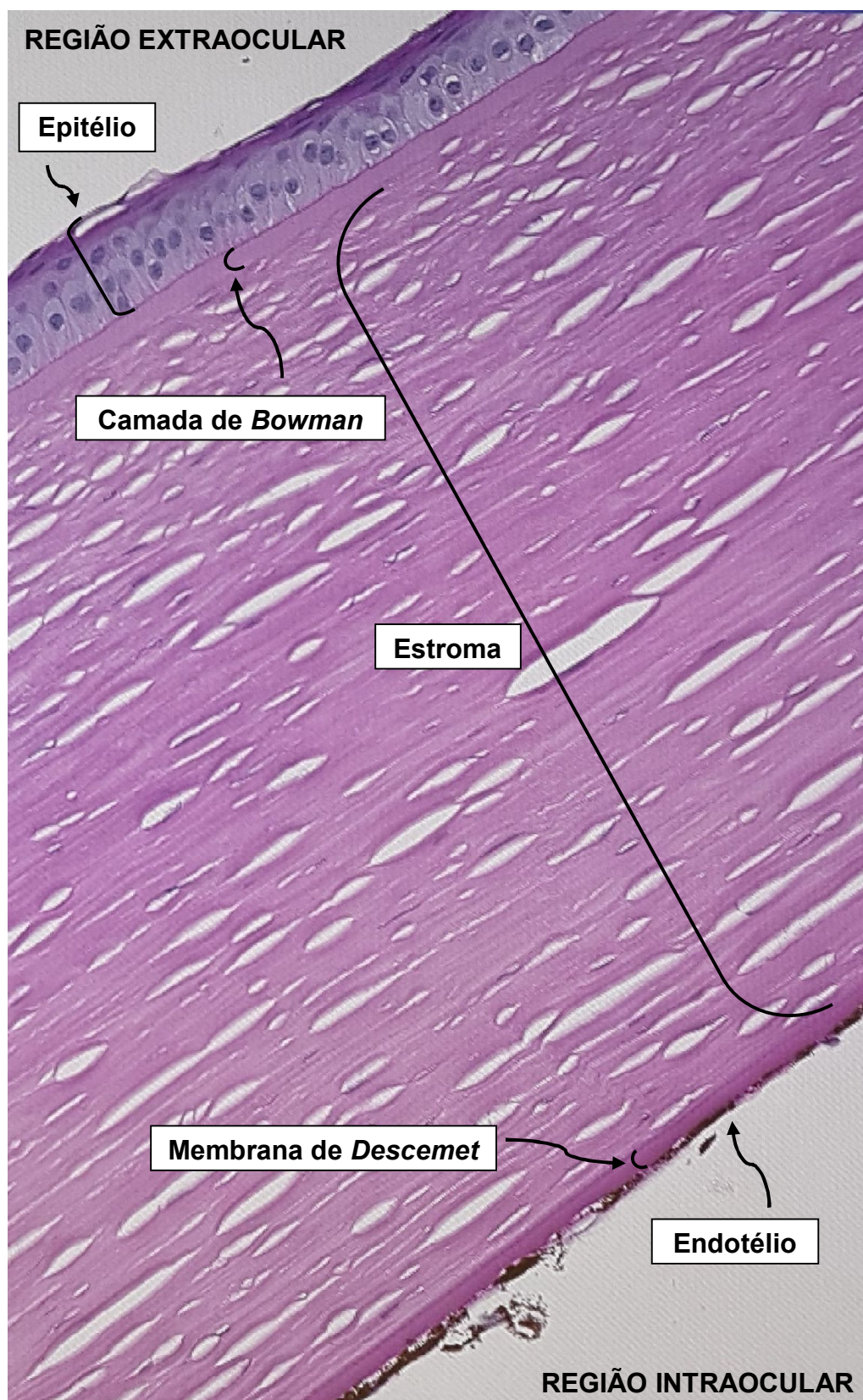
As primeiras descrições com referência à córnea podem ser encontradas nos manuscritos egípcios, datados de aproximadamente 2000 a.C.⁽³²⁾. O interesse nesta estrutura sempre foi grande na humanidade, uma vez que a baixa visual e a cegueira devido a infecções e cicatrizes sempre estiveram presentes desde os tempos mais remotos⁽³²⁾. À medida em que a sociedade começou a se organizar, desordens acometendo a córnea tiveram acréscimo de opacidades originadas da aplicação de elaboradas misturas com ingredientes exóticos, rituais que faziam parte da complexa crença médica do passado⁽³²⁾.

Nos tempos medievais não houve muitos avanços científicos relacionados à córnea, tudo o que se sabe da época envolve contos e misticismo⁽³²⁾.

Do século XVII, se reportam as primeiras descrições detalhadas de sua anatomia e espessura, através do trabalho do microbiologista holandês Antonie van Leewenhok e suas observações microscópicas^(1, 32).

A córnea adulta tem um diâmetro de aproximadamente 10,5 milímetros (mm) no sentido vertical e 11,5 mm no sentido horizontal⁽³³⁾. Suas superfícies anterior e posterior se encontram paralelas entre si⁽³³⁾. Seus 4 mm centrais têm uma forma esférica e apresenta a zona óptica, com 0,5 mm de espessura⁽³³⁾. Há um pequeno aplanamento da sua curvatura periférica, nessa área as superfícies anterior e posterior não estão mais dispostas paralelas entre si e sua espessura aumenta atingindo uma média de 0,65 mm⁽³³⁾.

O conhecimento das diferentes camadas corneanas sempre foi valorizado ao longo dos anos⁽³⁴⁾. Atualmente, sua anatomia primária é composta por 5 camadas: epitélio, camada de *Bowman*, estroma, membrana de *Descemet* e endotélio (Figura 1)⁽²⁹⁾.



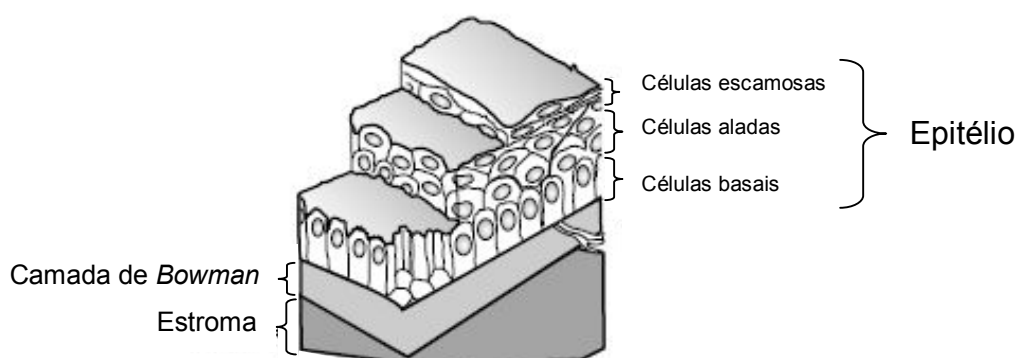
Fonte: Figura obtida do banco de imagens da tese.

Figura 1. Aspecto histológico das camadas corneanas em humanos, coloração ácido periódico de Schiff (PAS), aumento microscópico de 20x.

Estudos conduzidos pelo Prof. Harminder S. Dua em 2013 cogitaram uma nova camada corneana, pré-*Descemet*, evidenciada após o aumento da frequência das ceratoplastias lamelares anteriores e utilização de técnica com injeção de ar profundamente no estroma⁽³⁵⁾. A histologia confirmou que a clivagem ocorria acima da última fileira de ceratócitos⁽³⁵⁾. E esta suposta camada foi descrita como acelular, medindo cerca de 10.15 ± 3.6 micra (μm), apresentando cinco a oito lamelas de bandas de colágeno tipo I, arranjadas nas direções transversal, longitudinal e oblíqua⁽³⁵⁾. A partir desta pesquisa, o debate acerca da anatomia corneana foi reavivado, e desde então se discute a possibilidade da existência desta camada⁽³⁵⁾.

2.1.1 Epitélio

Consiste na camada corneana em contato com o filme lacrimal e o meio ambiente, composta por cinco a seis fileiras de células epiteliais escamosas não queratinizadas⁽³⁰⁾. Há uma fileira única de células basais colunares em contato com a membrana basal, duas ou três fileiras de células aladas, e duas ou três fileiras de células escamosas superficiais (Figura 2). A atividade mitótica é maior na camada basal e habitualmente ausente na camada mais superficial; nesta última camada as células são constantemente substituídas por células advindas das camadas mais profundas^(1, 36, 37).



Fonte: Adaptado de Coster DJ. Fundamentals of Clinical Ophthalmology – Cornea: BMJ Books; 2002.p. 22⁽³⁰⁾.

Figura 2. Representação esquemática da camada epitelial corneana em humanos.

As junções epiteliais celulares são bem identificadas por microscopia eletrônica, constituídas por hemidesmossomos e complexos conectivos, que recebem o nome também de *macula ocludens*⁽³⁸⁾.

A membrana basal epitelial é composta por matriz extracelular secretada pelas próprias células basais⁽³⁹⁾. Após a destruição da membrana basal, aproximadamente seis semanas são necessárias para sua reconstrução⁽³⁰⁾. Em condições normais, laminina e colágeno tipo IV são os principais componentes da membrana basal, entretanto, a produção de fibronectina aumenta consideravelmente em situações de injúria epitelial⁽³⁹⁾. A membrana basal apresenta aproximadamente 0,05 micrômetro (μm) de espessura e se adere à estrutura subjacente, a camada de *Bowman*, através de um mecanismo pouco compreendido que envolve placas e fibrilas de ancoragem⁽³⁹⁾.

2.1.2 Camada de *Bowman*

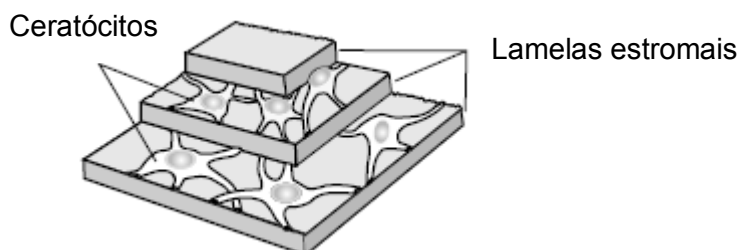
A camada de *Bowman* (William Bowman, oftalmologista inglês, 1816-1892) está localizada na interface entre o epitélio e o estroma. Abrange uma compactação de fibras de colágeno (principalmente os tipos I e II) e proteoglicanos, e não possui propriedades regenerativas⁽³⁰⁾.

Atualmente, alguns pesquisadores defendem que ela seja uma modificação do estroma anterior através de uma diferente orientação de suas fibras colágenas – estas fibras se apresentam circundando áreas constituídas por substâncias mucoproteicas, tendo por esta razão uma configuração diferente do restante da lâmina/substância própria⁽³¹⁾. Apresenta também numerosos poros na sua parte interna, úteis para passagem das terminações nervosas⁽³⁸⁾.

2.1.3 Estroma ou substância própria

O estroma corneano ou substância própria compreende aproximadamente 90% da espessura da córnea^(30, 40). Em sua composição apresenta principalmente colágeno tipo I e menores quantidades do tipo III, V e VII, e proteoglicanos (glicoproteínas extracelulares, cuja estrutura consiste em uma proteína central ligada a vários glicosaminoglicanos)^(29, 30). Os principais proteoglicanos encontrados no

estroma são a decorina (associada com o sulfato de dermatan) e lumican (associado com o sulfato de queratan), além da condroitina^(29, 30). Ainda, apresenta fibroblastos e ceratócitos que sintetizam e se dispõem entre as lamelas de colágeno e glicosaminoglicanos (Figura 3)⁽³⁰⁾. Estas duas células também produzem enzimas (por exemplo metaloproteases) que degradam o colágeno⁽³⁰⁾.



Fonte: Adaptado de Coster DJ. Fundamentals of Clinical Ophthalmology – Cornea: BMJ Books; 2002.p. 23⁽³⁰⁾.

Figura 3. Configuração das lamelas de colágeno e dos ceratócitos no estroma corneano em humanos.

As fibrilas de colágeno formam aproximadamente 300 lamelas distintas no estroma, cada lamela encobrindo a área total corneana e paralela à superfície⁽³⁰⁾. A transparência da córnea é atribuída ao espaçamento extremamente regular das fibrilas de colágeno e dos glicosaminoglicanos, macromoléculas que desempenham um papel crucial na hidratação do estroma⁽³⁰⁾.

2.1.4 Membrana de *Descemet* ou de *Demours*

A membrana de *Descemet* (Jean Descemet, médico anatomista francês, 1732-1810) também chamada de membrana de *Demours* (Pierre Demours, oftalmologista francês, 1702-1795) ou lâmina posterior elástica/lâmina posterior limitante, foi primeiramente descrita por ambos os médicos, entre 1769 e 1771, através de cartas em publicações médicas na época⁽⁴¹⁾.

Sendo objeto de especial atenção desta tese, a membrana de *Descemet* (MD) repousa na região posterior do estroma corneano, e é tida como uma membrana basal verdadeira, produzida pelas células endoteliais periféricas da córnea⁽⁴²⁾. Encobre toda a extensão corneana, até o endotélio trabecular⁽⁴²⁾.

A MD é caracterizada como uma membrana eosinofílica quando corada com hematoxilina-eosina (HE) (o termo eosinofílica deriva de eosina - um corante ácido, vermelho rosado), contínua, sem espaços intercelulares ou septos⁽³⁰⁾. Ainda, cora-se intensamente pelo corante ácido periódico de *Schiff* (PAS, do inglês *Periodic acid-Schiff*), sendo semelhante neste aspecto a todas as outras membranas basais dos tecidos humanos⁽⁴²⁾. Quando traumatizada *in vivo*, tende a sofrer retração, indicando uma inerente elasticidade⁽⁴³⁾.

O início desta camada se dá nos quatro primeiros meses gestacionais, tendo a formação de sua camada superior (com septos de acoragem ao estroma) completada ao final da gestação⁽⁴⁴⁾.

Alguns autores descrevem a maturação da MD como envolvendo três processos primordiais: os primeiros dois ocorrendo na vida pré-natal e o terceiro sendo um processo pós-natal^(44, 45). Dois processos estão relacionados especificamente com o crescimento em espessura desta membrana, e o outro processo envolve a diferenciação desta em uma estrutura estriada⁽⁴⁵⁾.

Ela pode inicialmente ser encontrada em embriões de 36 mm (entre 10 e 11 semanas gestacionais) como uma fina membrana anterior às células cuboides que originarão o endotélio⁽⁴⁴⁾. Esta fina membrana já nesta fase se assemelha a uma membrana basal, aderida ao estroma posterior, possuindo uma forma descontínua⁽⁴⁴⁾.

Em um embrião de 54 mm (aproximadamente 12 semanas gestacionais) são encontradas células primordiais do estroma corneano alongadas em direção ao maior eixo da córnea e processos celulares modificados delas advindos, ajudando a formar uma MD primitiva que possui características celulares (Figura 4)⁽⁴⁴⁾. Com seu desenvolvimento, em um embrião de 80 mm (cerca de 14 semanas) a MD já não está mais fragmentada e possui raros septos intercelulares, apresentando aspecto eosinofílico⁽⁴⁴⁾. Contudo, durante o seu processo de formação, sua espessura não é regular, adquirindo uniformidade no estágio de um feto de 210 mm (entre 20 e 21 semanas gestacionais)⁽⁴⁴⁾.

Durante o último trimestre de gestação, é maior a compactação das lamelas estriadas que formam a parte anterior da MD, o que pode estar relacionado com o concomitante encurtamento dos filamentos que formam pontes de ligação cruzada e ancoragem. Embora a MD nesta fase ainda mantenha o aspecto laminado, se torna

cada vez mais difícil discernir espaços separando as lamelas que compõe a MD ao final da gestação e/ou ao nascimento⁽⁴⁵⁾.



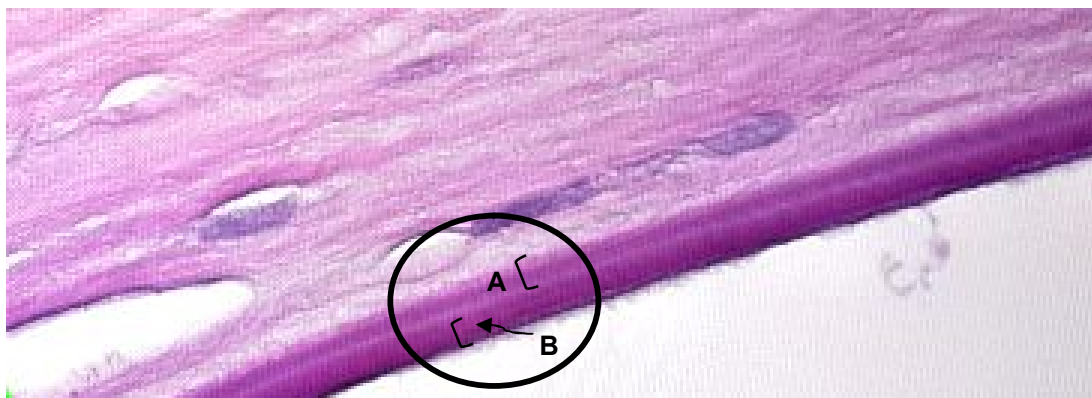
Fonte: Sevel D, Isaacs R. A re-evaluation of corneal development. Trans Am Ophthalmol Soc. 1988;86:178-207.p.189⁽⁴⁴⁾.

Figura 4. Membrana de Descemet primitiva, em um feto humano de 61 mm (aproximadamente 12 semanas gestacionais), aumento de 650x. A seta destaca a característica celular e fragmentada desta membrana.

Após o parto, a MD continua a se espessar através de um processo resultante da deposição de material homogêneo, não-estriado e não-lamelar⁽⁴⁵⁾. Este material forma uma espécie de segunda camada dentro da MD, comumente referenciada como a camada pós-natal, que pode ser claramente distinguida da camada estriada pré-natal em todos os humanos de qualquer idade após o nascimento⁽⁴⁵⁾.

Uma vez completada sua maturação, a MD apresenta uma região de origem fetal, anterior, estriada, de aproximadamente 3 μm de espessura; e outra região posterior de aspecto amorfo e não estriada, que aumenta de espessura pós-natal (aproximadamente 1 μm por década), devido à secreção contínua das células endoteliais (Figura 5)⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾. Por esta razão a MD é mais espessa em adultos do que em crianças, possuindo 3 a 4 μm de espessura ao nascer e 10 a 12 μm aos 50 anos

de idade⁽³⁸⁾. Normalmente este aumento de espessura é uniforme, exceto em algumas enfermidades, cujo espessamento é localizado (por exemplo, na distrofia de Fuchs)⁽³⁸⁾.



Fonte: Figura obtida do banco de imagens da tese.

Figura 5. Membrana de *Descemet* (círculo) e suas regiões anterior estriada (A) e posterior não-estriada (B), coloração PAS, aumento de 40x. Figura obtida do banco de imagens da tese.

À medida que sujeitos normais envelhecem, as células endoteliais decrescem em número, mas suas respectivas MD aumentam em espessura^(16, 45, 48). De acordo com alguns pesquisadores, o complexo MD/endotélio cresce 1,2 μm por década em córneas normais^(16, 49). Eles ainda afirmam que nos casos em que as células endoteliais sofrem algum estresse, a MD pode aumentar em uma taxa muito maior e atingir o dobro ou o triplo de sua espessura anterior^(16, 49).

A MD é constituída principalmente por colágeno do tipo IV, VII e XVIII, proteínas e glicoproteínas⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾. Detalhes ultraestruturais da interface entre a MD e o estroma já foram previamente descritos, incluindo uma malha fina intermediária formada por fibrilas de colágeno aleatoriamente distribuídas e se projetando através da região anterior da MD, complexos da matriz extracelular formados por ceratoepitelina (fator de crescimento β -induzido), e também colágeno tipo VI, sugerindo uma firme conexão entre a MD e o estroma posterior⁽⁵⁰⁻⁵³⁾.

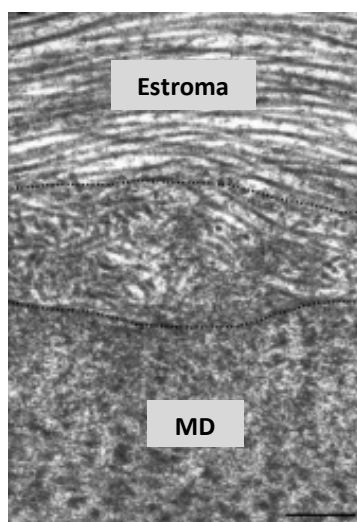
Nos últimos anos, se aprofundaram os conhecimentos acerca da estrutura e características bioquímicas desta camada; que contém quantidades superiores de glicoproteínas com função de adesão na maior parte de sua zona anterior, formando uma matriz que serve de interface mediando à aderência ao estroma^(50, 54).

Seu comportamento fisiológico e plano de clivagem, bem como de sua morfologia inter-individual e variações bioquímicas, impedem seu desnudamento e

de todo o complexo corneano em aproximadamente 2% das córneas doadas aos bancos de olhos com a finalidade de enxertia^(55, 56).

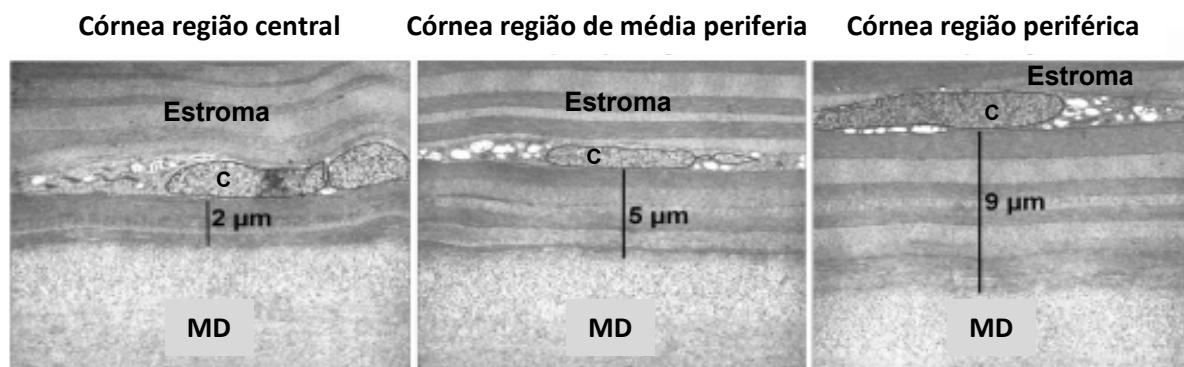
Na interface MD/estroma posterior há uma camada intermediária de aproximadamente 0,5 a 1 μm consistindo de fibrilas colágenas frouxamente dispostas com diâmetro variando entre $21,5 \pm 2,1$ nanômetros (nm)⁽⁵⁰⁾. Estas fibrilas colágenas não estão alinhadas em feixes, mas entrelaçam muito próximas umas às outras em um formato de trama, lembrando o aspecto da camada de *Bowman* em sua interface com o estroma anterior (Figura 6)⁽⁵⁰⁾.

Há ainda uma variação da disposição dos ceratócitos encontrados na região do estroma posterior em relação à MD: na área central corneana estes ceratócitos estão mais próximos da MD e vão gradativamente aumentando sua distância na direção da periferia corneana (Figura 7)⁽⁵⁰⁾.



Fonte: Adaptado de Schlotzer-Schrehardt U, Bachmann BO, Tourtas T, Torricelli AA, Singh A, Gonzalez S, et al. Ultrastructure of the posterior corneal stroma. *Ophthalmology*. 2015;122(4):693-9.p.697⁽⁵⁰⁾.

Figura 6. Micrografia de transmissão eletrônica demonstrando a interface do estroma posterior e da membrana de *Descemet* (MD) em humanos.

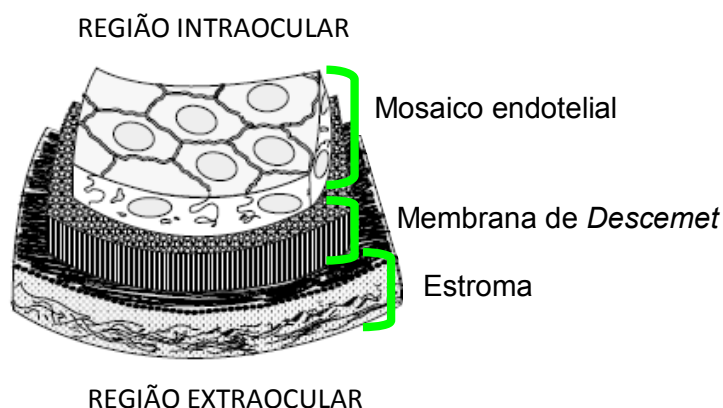


Fonte: Adaptado de Schlotzer-Schrehardt U, Bachmann BO, Tourtas T, Torricelli AA, Singh A, Gonzalez S, et al. Ultrastructure of the posterior corneal stroma. *Ophthalmology*. 2015;122(4):693-9.p.695⁽⁵⁰⁾.

Figura 7. Micrografias de transmissão eletrônica demonstrando a variação de distância dos ceratócitos estromais (C) da membrana de Descemet (MD) em humanos. Da esquerda para direita: regiões central, média periferia e periférica corneanas.

2.1.5 Endotélio

Abaixo da MD encontra-se o endotélio (Figura 8). É composto por uma única camada de células hexagonais, semelhante a um mosaico, cuja importância está no papel que desempenha na deturgescência corneana⁽³⁰⁾. Em condições normais o mosaico endotelial é bastante regular⁽³⁰⁾. As importantes responsabilidades metabólicas atribuídas ao endotélio são refletidas na sua citologia: as células possuem núcleo grande e muitas organelas citoplasmáticas desenvolvidas, além de microvilosidades e dobras marginais, a fim de aumentar a área de superfície celular e facilitar suas funções⁽³⁰⁾.



Fonte: Adaptado de Coster DJ. *Fundamentals of Clinical Ophthalmology – Cornea*: BMJ Books; 2002.p. 23⁽³⁰⁾.

Figura 8. Representação esquemática da região posterior corneana em humanos.

As células endoteliais corneanas podem ser detectadas primeiramente na sexta semana de gestação, migrando constantemente na direção central da córnea⁽³⁸⁾. Muito do nosso conhecimento sobre esta estrutura celular é derivado de estudos de microscopia eletrônica de transmissão e varredura e, mais recentemente, através de estudos histoquímicos⁽³⁸⁾.

O endotélio corneano, primariamente, era considerado como de origem mesoendotelial, sendo agora considerado como originário da crista neural⁽³⁸⁾. Possui uma estrutura semelhante ao endotélio dos vasos sanguíneos⁽³⁸⁾.

Uma particularidade das células endoteliais que merece destaque é que elas não se proliferam *in vivo*, mas podem se dividir em culturas celulares^(29, 57). Embora algumas evidências apontem para a possibilidade de haverem células pluri-potenciais na periferia corneana, a densidade de células endoteliais declina ao longo da vida, como já mencionado^(29, 58). O endotélio pode exibir alterações metaplásicas sob algumas condições patológicas, entre elas as degenerativas e as distróficas⁽³⁸⁾.

Consiste em uma camada difícil de ser estudada em histopatologia, pois usualmente se desprende da córnea durante o manejo e preparação das lâminas.

2.2 Transplante corneano e rejeição

A córnea consiste em uma parte ocular tecnicamente factível de ser transplantada⁽⁵⁹⁾. Milhares de pacientes têm a visão restaurada através da substituição de uma córnea doente por um transplante corneano alógeno⁽⁵⁹⁾.

Embora o transplante corneano tenha sido realizado ao longo de mais de um século, evidencia-se um aumento dramático desde os anos de 1960⁽²⁾. Ele tem sido aperfeiçoado desde formas mais primitivas até as modernas cirurgias atuais devido à melhoria nos processos dos bancos de olhos, na técnica cirúrgica, nos materiais, avanços na qualidade óptica dos microscópios e melhores medicamentos utilizados para suprimir a inflamação pós-operatória⁽²⁾. Todos estes fatores contribuíram para o aperfeiçoamento da cirurgia de transplante de córnea e auxiliaram na análise das causas de falência do enxerto, seja esta falência primária ou secundária⁽²⁾.

Primeiramente descrita por Paufigue et al. em 1948, posteriormente por Maumenee em 1951 e por último tendo seu conceito aperfeiçoado por Khoudadoust e Silvestein em 1969, a rejeição de um enxerto corneano é um processo específico

no qual um transplante que estava previamente transparente pelo período de duas semanas repentinamente sucumbe a edema corneano, em conjunto com sinais e sintomas de inflamação no segmento anterior^(2, 60, 61). Este processo é imunologicamente mediado e representa o final de uma cadeia que pode levar a dano reversível ou irreversível da córnea⁽²⁾.

O trauma cirúrgico ocasionado pelo transplante compromete o privilégio imunológico, inerente à córnea, expondo os enxertos corneanos ao risco de rejeição⁽⁵⁹⁾. Este privilégio deriva da anatomia e da biologia celular deste tecido: a córnea é avascular e não contém vasos linfáticos, e as células corneanas, no geral, expressam baixos níveis de antígenos de histocompatibilidade⁽⁵⁹⁾.

Está claro que a inflamação e neovascularização do enxerto, que ocorrem a seguir de um transplante, o predispõem à rejeição através de resposta celular imunomediada⁽⁵⁹⁾. A antigenicidade das células corneanas tem sido estudada e foi descoberto que ela é significativamente menor se comparada com a de outras células ou tecidos⁽⁵⁹⁾.

A rejeição, neste sentido, consiste em um processo mediado por células diretamente contra o complexo de histocompatibilidade principal envolvendo ambas as células T CD4+ *helper* e CD8+ citotóxicas⁽⁵⁹⁾. A prevenção de rejeição nos transplantes de córnea depende primariamente do desenvolvimento de compostos que, quando aplicados topicamente, são capazes de prevenir a inflamação e vascularização e inibir a ativação dos linfócitos, bloqueando esta cadeia imunológica que conduz à rejeição⁽⁵⁹⁾.

Representando uma das principais complicações pós-operatórias em um transplante penetrante, a rejeição é ainda a causa mais comum de falência de enxertos corneanos, tanto no período intermediário quanto tardio após a cirurgia, sendo uma das principais causas de procura aos serviços de emergência oftalmológica em pacientes transplantados⁽²⁾.

A taxa de rejeição varia enormemente entre os estudos: de 2,3% até 68%^(2, 62, 63). Aproximadamente 12% das rejeições em córneas de pacientes com bom prognóstico na ceratoplastia e 40% dos casos complicados estão relacionados à subsequente falência do enxerto⁽²⁾.

Uma córnea apresentando falência devido a qualquer causa é considerada como sendo de alto risco para rejeição, e o risco é ainda maior se esta falência foi devido a uma rejeição prévia⁽²⁾.

Há uma série de condições que podem mimetizar uma rejeição e podem ser confundidas com este quadro: falência tardia do enxerto, endoftalmite estéreis ou infecciosas, crescimento epitelial em local inapropriado e recorrência de ceratite herpética, além de ceratopatia cristalina infecciosa^(2, 62).

Sendo condição com alta incidência e possíveis comorbidades importantes, novos esforços têm se concentrado na identificação e erradicação de fatores de risco, bem como no diagnóstico precoce da rejeição e falência corneana. Estudos envolvendo microscopia especular confocal e tomografia de coerência óptica têm emergido nos últimos tempos, na tentativa de identificar uma rejeição mais precocemente^(12, 15).

2.3 Preparo histológico de tecidos

A histologia impulsionou o aprendizado em medicina, e seus avanços não ficaram apenas restritos à descrição das camadas teciduais⁽⁶⁴⁾. Eles puderam tornar compreensíveis desde a embriologia, passando pela fisiologia, até a genética. Neste sentido, para que tenha propósitos científicos, a histologia investigativa tem início com uma preparação adequada, a fim de proporcionar identificação e caracterização precisa das estruturas. A preparação histológica pode ser resumida nas etapas de fixação, desidratação e diafanização, inclusão, microtomia, coloração e montagem das lâminas⁽⁶⁵⁾.

A fixação do tecido a ser analisado é fundamental para preservação de sua estrutura, impedindo a rápida deteriorização celular⁽⁶⁵⁾. Os fixadores atuam estabelecendo ligações transversais entre as proteínas intra e intercelulares⁽⁶⁶⁾. No último século métodos químicos (soluções de formol, líquido de *Bouin*, entre outros) e físicos (resfriamento ou aquecimento) foram desenvolvidos com o objetivo de interromper este processo de degradação tecidual^(64, 67). O método mais comum de fixação é por embebição em uma solução. Quando a amostra tecidual é espessa, é necessário realizar sua secção ou clivagem para permitir melhor penetração do fixador⁽⁶⁴⁾.

A solução fixadora mais utilizada e estudada nos departamentos de patologia é a formalina 10%, um composto de formaldeído 40% e água⁽⁶⁶⁾. Ela estabiliza proteínas, lipídeos e carboidratos, além de evitar a autólise⁽⁶⁶⁾. Por difundir-se relativamente rápido através do tecido, não se fazem necessárias clivagens no

tecido, uma vez que a espessura normal do olho é de aproximadamente 2 a 3 mm, relativamente pequena em relação aos demais órgãos humanos⁽⁶⁸⁾.

Fixada a amostra, procede-se a sua desidratação através de banhos com agentes desidratantes (por exemplo, concentrações crescentes de etanol 70% até 100%)⁽⁶⁹⁾. Após a desidratação, é realizada a diafanização ou clareamento, com a finalidade de substituir a substância desidratante presente na amostra por uma substância intermediária miscível tanto na substância utilizada para desidratação quanto na utilizada na etapa de inclusão⁽⁶⁹⁾.

O globo ocular, sendo constituído por tecidos de diferentes consistências, tem seu corte notoriamente trabalhoso, mesmo após o processo de fixação histológica⁽⁷⁰⁾. Assim, para que todas as camadas permaneçam unidas, é necessário também o processo de inclusão, permitindo o fácil corte do tecido⁽⁷⁰⁾. Atualmente, existem três técnicas de inclusão: em parafina, em plástico ou resina e através de congelamento.

A blocagem (ou inclusão) em parafina é a técnica mais utilizada para o globo ocular, por ser um processo rápido e permitir fácil corte seriado do tecido⁽⁶⁹⁾. Além disso, possibilita o uso de diferentes corantes, incluindo os utilizados em imunohistoquímica⁽⁷⁰⁾. Ao ser imersa em parafina fundida e colocada em uma estufa com temperaturas de 56-60 graus Celsius (°C), o calor promove a evaporação da substância intermediária e a ocupação dos espaços teciduais por parafina⁽⁶⁹⁾.

Entretanto, a parafina pode produzir alguns artefatos indesejados se não for manuseada de forma correta: encolhimento ou endurecimento excessivo do tecido quando exposta a temperaturas acima de 60 °C e fraca adesão entre o corte histológico e a lâmina de vidro para microscopia caso não permaneça em estufa a 37 °C por 12 horas, durante o seu período de preparação⁽⁷⁰⁾.

Uma vez concluída a inclusão, os blocos são levados ao micrótomo para serem cortados em finas secções que podem variar de 1 a 60 μm ⁽⁷¹⁾. Logo após estes cortes são distendidos em água aquecida, a fim de evitar micro-dobras. A seguir, são coletados utilizando lâminas de vidro e posteriormente encaminhados para secagem. As lâminas podem então serem coradas e encobertas por resina sintética e lamínulas.

2.4 Histopatologia e microscopia digital

Patologistas têm se utilizado de microscópicos luminosos para diagnóstico das doenças em secções de tecido ou em lâminas de vidro desde o desenvolvimento da moderna patologia por Rudolf Virchow em 1858⁽⁷²⁾. Assim, nos últimos 350 anos, a microscopia tem sido o principal método de análise estrutural dos organismos vivos no âmbito celular⁽⁷³⁾.

Os avanços tecnológicos na microscopia têm promovido não somente o trabalho dos pesquisadores na descoberta da relação entre função e estrutura das células, tecidos e organismos, mas também têm deixado sua marca no ensino de várias disciplinas biológicas e médicas, especificamente histologia, patologia e mais recentemente biologia celular⁽⁷³⁾. Histologia e patologia, que consistem no estudo dos tecidos e das doenças a nível celular como anteriormente citado, são matérias visivelmente afetadas pelo nível de conhecimento adquirido pelo aprendiz ao interpretar e analisar imagens microscópicas de células, tecidos e órgãos⁽⁷³⁻⁷⁵⁾. Desde o final do século XIX, esta habilidade tem sido primariamente ensinada aos estudantes médicos e odontólogos utilizando microscópios ópticos em combinação com conjuntos de lâminas de vidro contendo secções coradas de tecidos^(73, 76). Entretanto, o alto custo de microscópios ópticos de boa qualidade, conjuntos de lâminas de tecidos, e a manutenção e reposição destes recursos, bem como a disponibilidade e variabilidade limitada de certos espécimes teciduais impuseram significativas barreiras ao uso da microscopia óptica tradicional para a educação de histologia e patologia em muitas instituições, especialmente em países em desenvolvimento⁽⁷³⁾.

A microscopia óptica é vital para o diagnóstico histopatológico⁽²²⁾. No ensino da habilidade da microscopia óptica aos estudantes de medicina e aos médicos especializando em patologia, muito do treinamento é feito de modo prático⁽²²⁾.

Tipicamente, um estudante e um professor dividem um microscópio com várias entradas de lentes oculares, a fim de examinarem lâminas juntos, discutir casos e gerar um diagnóstico⁽²²⁾. Embora algumas características morfológicas possam ser destacadas pelo operador principal do sistema utilizando um marcador ou seta, os enfoques dependem da suposição que todos os participantes estão realmente vendo as mesmas imagens ao mesmo tempo e apresentam processos cognitivos comparáveis⁽²²⁾. Na verdade, estas premissas nunca foram validadas⁽²²⁾.

Notadamente, pouco se sabe sobre os fatores humanos que afetam a proficiência dos patologistas em microscopia óptica⁽²²⁾. As habilidades cognitivas e visuais dos patologistas têm relativamente pouca atenção em comparação com a vasta literatura considerando estudos de desempenho em radiologia⁽²²⁾. Uma das razões para este lapso de estudos regulares considerando função visual em patologia são as restrições impostas pelo posicionamento da cabeça do operador nas lentes oculares dos microscópios⁽²²⁾. Estas lentes atuam, por vezes, como um bloqueio ao acesso dos olhos do operador e impedem a completa movimentação ocular do microscopista⁽²²⁾.

Resultados de biópsias e análises histopatológicas requerem não somente conhecimento especializado, mas também a identificação de regiões críticas no material e apropriada classificação frente às características encontradas^(20, 77, 78). Este processo é excessivamente complexo e dinâmico, bem como vulnerável à incorreta identificação, mal-interpretação e finalmente a erros diagnósticos (falso-positivos e falso-negativos)⁽²⁰⁾. Uma vez que os erros diagnósticos podem contribuir para tratamentos excessivos e desnecessários, com significativo impacto nos pacientes, é importante compreender as circunstâncias nas quais os erros emergem e os prevenir⁽²⁰⁾.

Quando a microscopia digital foi introduzida, há aproximadamente 20 anos, ela prontamente se tornou uma alternativa popular à microscopia óptica clássica e está agora progressivamente substituindo o método tradicional dos laboratórios no ensino de histologia e patologia^(73, 76, 79-83). Imagens teciduais digitais são tipicamente produzidas de lâminas de vidro tradicionais de histologia/patologia utilizando um escaneamento completo destas, através de um microscópio luminoso com estágios automatizados e uma câmera digital de alta resolução^(79, 84). *Softwares* especiais agrupam as imagens individuais formando um conjunto, a fim de gerar uma composição completa da imagem tecidual em alta resolução⁽⁷³⁾.

Similar ao *Google Earth*[®] (Google Inc.; Mountain View, Califórnia/EUA), mas em escala microscópica, estes arquivos de imagens eletrônicas (algumas vezes excedendo vários gigabits de tamanho), são armazenados em um computador central que serve como terminal, e pode ser acessado através da Internet ou redes locais⁽⁷³⁾.

Utilizando aplicativos para visibilização de imagens ou um navegador, estudantes podem exibi-las nas suas telas de computador⁽⁷³⁾. Como somente uma

pequena parte de toda a imagem digitalizada é baixada para um campo de estudo, os estudantes podem rapidamente navegar através dela e aumentar ou diminuir seu tamanho a fim de obter uma visualização global da lâmina ou procurar por pequenos detalhes em uma magnificação maior⁽⁷³⁾.

Aprendizes geralmente respondem positivamente à introdução de microscopia digital e várias publicações têm reportado uma correspondente melhora nos desempenhos de aprendizado em estudantes de cursos de histologia e patologia^(73, 85-87).

Além disso, estudos na área demonstraram que patologistas revisando imagens digitais tendem a fixar mais frequentemente seus olhos em regiões da imagem que contém informações relevantes ao diagnóstico^(20, 88). Outras pesquisas revelam que esta ferramenta também é capaz de aumentar não somente a atenção na imagem, mas o nível de modulações cerebrais utilizadas para realização do diagnóstico⁽²⁰⁾.

Esta tecnologia emergente permite a criação de bibliotecas virtuais e armazenamento de casos educacionais para treinamento. *Slides* digitais não sofrem as possíveis intempéries físicas das lâminas de vidro (por exemplo, desbotamento das colorações, quebra dos vidros, custos com transporte), e são mais eficientes para apresentar as informações a outros patologistas (em eventos ou palestras integradas com vários serviços e consultorias)⁽⁸⁹⁾.

À medida que esta tecnologia se desenvolve, algoritmos para análises das imagens prometem facilitar o trabalho dos patologistas e criar uma ferramenta eficiente e constante para auxílio diagnóstico⁽⁸⁹⁾.

Um dos maiores benefícios da implementação da patologia digital é que a visualização das lâminas pode ser enriquecida com experiências oferecidas pelos *softwares* dos *scanners* aos usuários: alteração de cores e balanço de contraste, alteração do posicionamento das figuras, visualização de mais de uma lâmina ao mesmo tempo, possibilidade de anotações e realização de medidas das estruturas, entre outros⁽⁹⁰⁾. Outras possibilidades são a construção de estações de trabalho de patologia digital com múltiplas telas e a reconstrução de estruturas de forma tridimensional (como utilizado em exames por imagem e radiologia) utilizando programas especiais (tecnologia de realidade virtual).

Entretanto, a criação de um laboratório inteiramente digital requer estrutura de informática especializada para armazenamento e acesso aos slides digitais, além de soluções para integrar os sistemas⁽⁹⁰⁾.

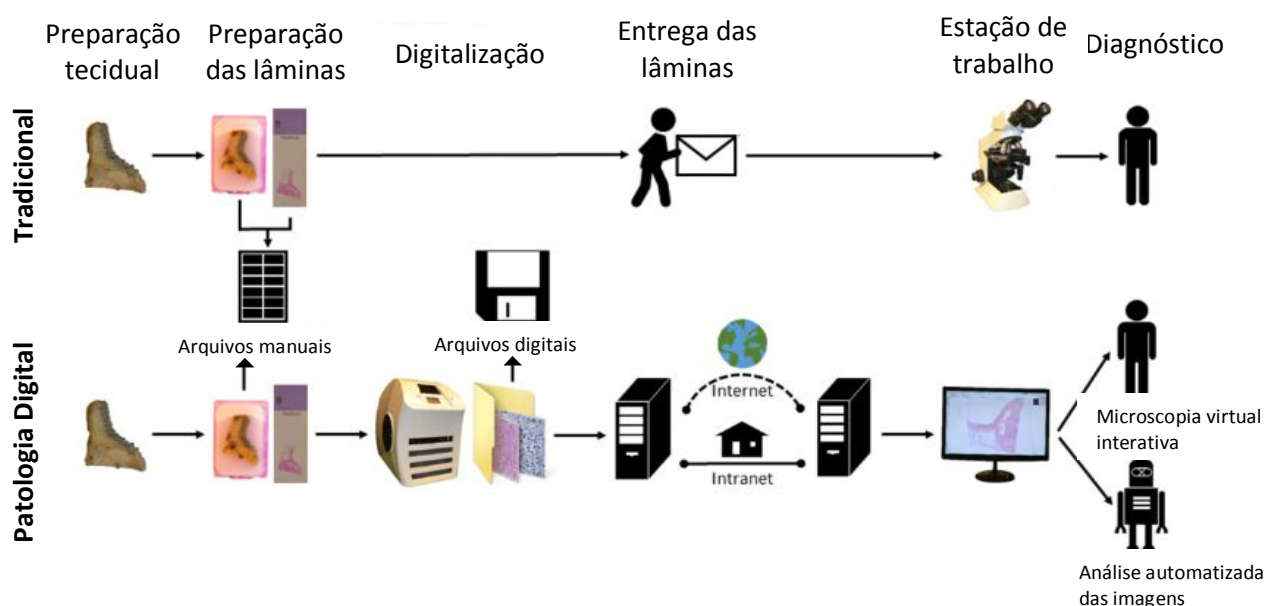
2.5 **Scanners digitais**

A patologia digital ou também chamada microscopia virtual pode ser descrita como a observação de lâminas microscópicas em uma tela de computador com uma qualidade de resolução óptica e poder de magnificação equivalentes ou até melhores que os microscópios luminosos convencionais. Seu desenvolvimento só foi possível devido ao surgimento de rápidos e confiáveis *scanners*, que são capazes de digitalizar as lâminas de vidro como um todo⁽⁷²⁾.

Estas imagens podem ser consultadas em sua forma integral, avaliadas, e armazenadas por tempo indeterminado e com qualidade constante⁽⁷²⁾. A visualização de uma destas imagens, ou *slide* virtual, não está restrita apenas à imagem de forma estática, mas inclui opções para movimentação horizontal (eixos “x” e “y” de um plano), aumento e diminuição do tamanho, e por vezes até focalização específica em algum sítio do *slide* (eixo “z” de um plano), sendo comparável a um microscópio óptico convencional⁽⁷²⁾.

A Figura 9 representa o fluxograma da patologia digital. O passo crucial que o separa da forma clássica é a digitalização das secções histológicas por um *scanner* digital em imagens completas, que subsequentemente podem ser manejadas e revisadas em uma estação computadorizada por um patologista (microscopia virtual interativa) ou acessadas para análises automatizadas das imagens⁽⁷²⁾.

Muitos tipos de *scanners* de diferentes marcas estão disponíveis atualmente⁽⁷²⁾. Apesar das diferenças nas configurações técnicas, todos os *scanners* são formados por quatro componentes prioritários que são mais ou menos equivalentes aos microscópios ópticos: uma fonte de luz, suporte de lâminas com um componente mecânico ou robótico para mover este suporte, uma ou mais lentes objetivas e uma câmera associada para capturar as imagens⁽⁷²⁾.



Fonte: Adaptado de Bertram CA, Klopffleisch R. The Pathologist 2.0: An Update on Digital Pathology in Veterinary Medicine. Vet Pathol. 2017;54(5):756-66.p.757⁽⁷²⁾.

Figura 9. Comparação entre o fluxo da patologia digital e tradicional.

A maioria dos *scanners* são equipados com uma fonte de luz de campo claro⁽⁷²⁾. *Scanners* com uma fonte de luz integrada para a ativação de fluorocromos para digitalização de colorações fluorescentes estão também disponíveis para análises de fluorescências a qualquer momento, nestes casos sem o perigo do desbotamento da coloração^(72, 91).

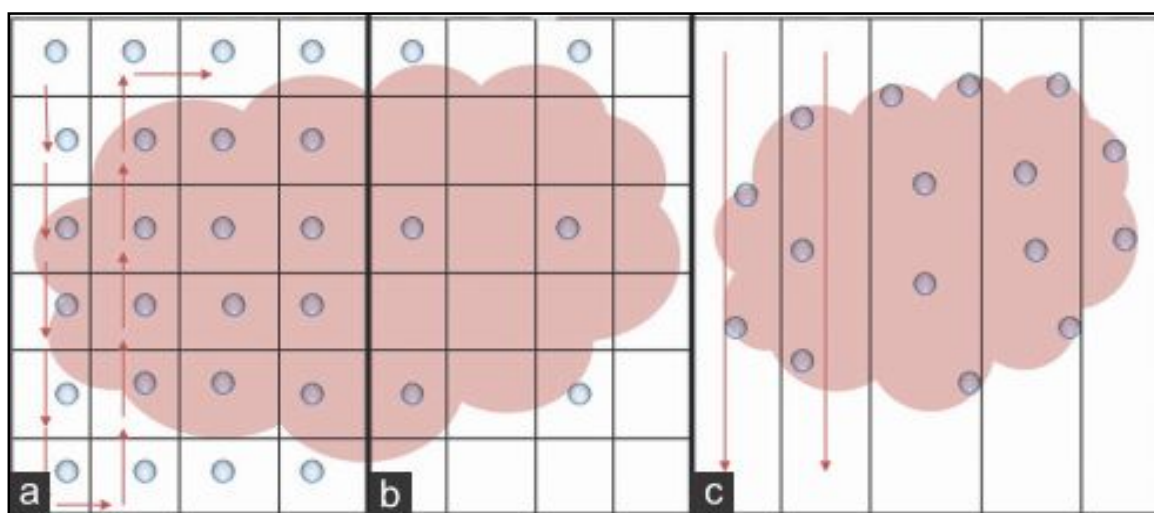
A capacidade máxima de armazenamento do suporte de lâminas dos diferentes *scanners* pode variar entre 1 a 400 lâminas⁽⁷²⁾. Este é um ponto importante a se considerar em laboratórios cuja demanda de análises é alta, a fim de otimizar o trabalho.

Por sua vez, as lentes objetivas utilizadas nos diferentes *scanners* podem variar suas magnificações de 2 a 100, o que permite aumentos de 20 a 1.000 vezes (x) o tamanho da tela, similar ao microscópio óptico convencional⁽⁷²⁾. *Scanners* podem ser compostos de lentes objetivas ou somente uma objetiva, cuja magnificação pode ser dobrada ao adicionar um segundo dispositivo⁽⁷²⁾. A maioria dos *scanners*, contudo, é equipada com 20 ou 40 lentes objetivas⁽⁷²⁾. A decisão sobre a magnificação utilizada durante o processo de escaneamento claramente depende do uso pretendido para as imagens⁽⁷²⁾.

A informação visual da lâmina é digitalizada por uma câmera com componente de alta resolução⁽⁷²⁾. A resolução e nitidez destas câmeras são semelhantes às fotografias digitais regulares no número e tamanho dos *pixels*^(72, 92).

Durante o processo de escaneamento, a câmera de alta resolução tira imagens únicas de pequenas áreas que posteriormente passam por um complexo processo de agrupamento para produzir uma imagem completa de toda a área da lâmina⁽⁷²⁾. Atualmente existem dois métodos de escaneamento disponíveis: escaneamento de pequenas áreas no formato de quadrados ou ladrilhos, ou escaneamento linear que produz imagens com formato de tiras; ambos são posteriormente compilados para formação da imagem como um todo (Figura 10)^(72, 92).

O tempo de escaneamento é tido como uma importante característica do *scanner*, especialmente quando grandes quantidades de lâminas são escaneadas diariamente para rotina diagnóstica⁽⁷²⁾. O tempo requerido para tal processo varia de acordo com os diferentes modelos e é altamente dependente do tamanho da área a ser escaneada⁽⁷²⁾. Em média, o tempo de escaneamento completo de uma lâmina varia entre 35 segundos a 3 minutos, dependendo do modelo do *scanner*^(72, 92).



● = Ponto de Focalização, ➔ = Direção do Escaneamento

Fonte: Adaptado de Indu M RR, Binu MP. "Slide less pathology": fairy tale or reality? J Oral Maxillofac Pathol 2016; 20:284-8.p.285⁽⁹³⁾.

Figura 10. Padrões de escaneamento dos *scanners* digitais. (a e b) Padrão em mosaico ou ladrilho. Os pontos azuis em "a" indicam padrão de focalização "em cada campo". Pontos azuis em "b" indicam focalização em áreas pré-determinadas a intervalos regulares. (Cortesia: Dr. Toby C. Cornish, PhD, Professor Assistente de Patologia, John Hopkins). (c) Padrão linear de escaneamento.

3 OBJETIVO

- 3.1 Aferir e comparar através de ferramentas histopatológicas digitais a espessura das camadas corneanas, em especial da membrana de *Descemet*, em córneas normais e córneas de enxertos apresentando falência devido à rejeição em amostras *ex vivo*.

4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Estudo experimental, transversal e analítico, realizado no laboratório de patologia ocular Henry C. Witelson (McGill University Health Centre and Research Institute), em Montreal, Quebec/Canadá.

4.2 Considerações éticas

Esta pesquisa corresponde à primeira etapa do projeto intitulado “Análise comparativa entre imagens de cortes histopatológicos e obtidas através de tomografia de coerência óptica em córneas”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (parecer número 1.642.065) (Anexo 1); tendo sido desenvolvida de acordo com os princípios que norteiam a Declaração de Helsinki.

4.3 Amostras em estudo

Espécimes corneanas humanas ou fragmentos de segmentos anteriores, provenientes do Banco de Olhos de Minessota/EUA, Banco de Olhos do Alabama/EUA e do departamento de patologia ocular da McGill University/Canadá. Os espécimes oculares fazem parte de convênios e projetos de pesquisa realizados entre a McGill University e os respectivos bancos de olhos (Anexo 2).

Como critérios de inclusão para este estudo considerou-se:

- Lâminas histológicas cujo diagnóstico clínico era córnea normal ou enxertos corneanos apresentando falência por rejeição;
- Amostras teciduais advindas de pacientes maiores de 18 anos de idade.

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Lâminas histológicas inadequadamente preparadas ou cujas camadas corneanas não podiam ser completamente visibilizadas através de microscopia;

- Prontuários incompletos ou pacientes cujas informações epidemiológicas (idade, gênero, lateralidade do olho e diagnóstico ocular) não pudessem ser obtidas.

Como córneas normais foram classificadas os tecidos provenientes de pacientes sem patologias oculares corneanas, que não haviam sido previamente submetidos a cirurgias intraoculares e não possuíam doenças oculares ou afinamentos corneanos descritos em seu prontuário médico. Córneas de enxertos apresentando falência por rejeição englobavam pacientes com este diagnóstico primário, contudo, outras doenças poderiam estar associadas a este diagnóstico, como ceratocone, glaucoma, entre outros.

4.4 Método

4.4.1 Preparo histológico

O preparo histológico dos exemplares estudados incluiu a fixação imediata do tecido após a sua retirada do sítio de origem por embebição em formalina 10% e recorte parcial preservando o segmento anterior. Antes da retirada do espécime de seu local, foram feitas marcações orientando as regiões nasal, temporal, superior e inferior.

A etapa de desidratação consistia na embebição do espécime em concentrações crescentes de álcool, a saber:

Álcool etílico 70 % - 1 hora;

Álcool etílico 80 % - 1 hora;

Álcool etílico 90 % - 1 hora;

Álcool etílico 100 % I - 1 hora;

Álcool etílico 100 % II - 1 hora.

Na diafanização a substância utilizada foi xileno.

A partir da etapa de desidratação 70%, as amostras eram preparadas de modo automatizado no Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory, utilizando os equipamentos: processador de amostras Leica TP1020[®] (Leica Biosystems; Concord, Ontário/Canadá) e emblocador de amostras Leica EG1150H[®] (Leica Biosystems; Concord, Ontário/Canadá) para inclusão. As amostras teciduais

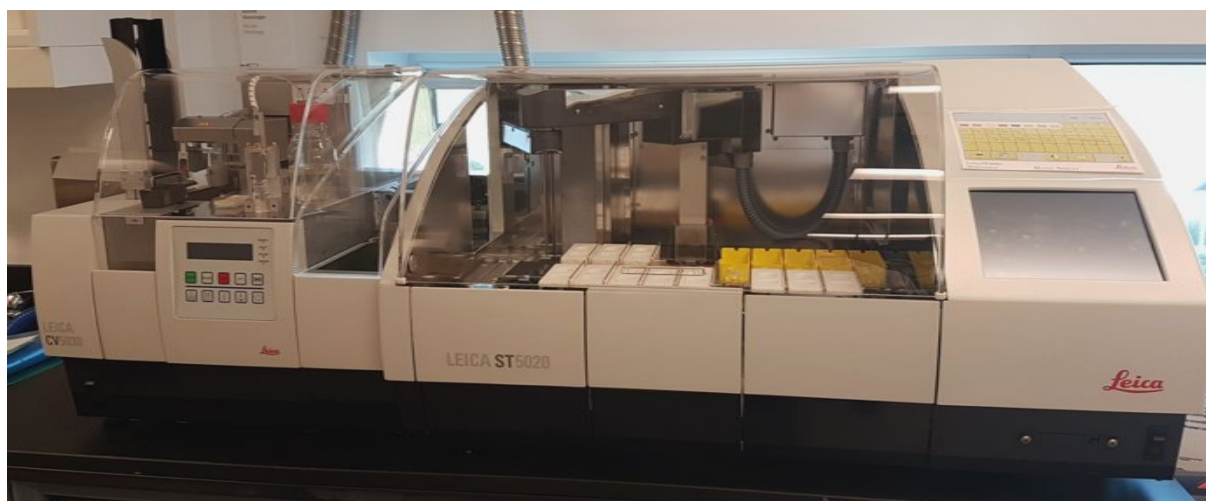


Figura 13. Leica ST5020®, sistema automatizado de coloração das lâminas histológicas.

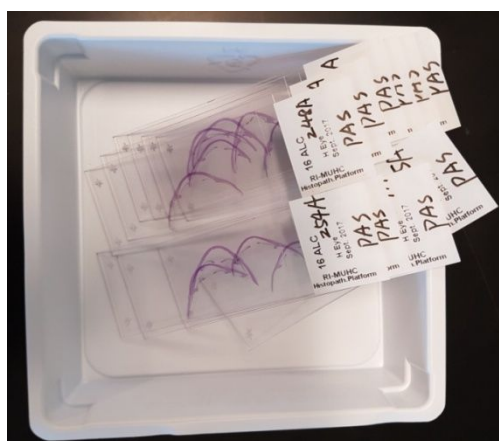


Figura 14. Exemplos de lâminas coradas com ácido periódico de Schiff (PAS).

4.4.2 Escaneamento e digitalização das lâminas

Uma vez concluída a etapa de preparação histológica, as lâminas foram digitalizadas para análise computadorizada utilizando Philips Ultra Fast Scanner 1.6 RA® (Philips Digital Pathology; Best, North Brabant/Holanda), um *scanner* para digitalização e análise de lâminas patológicas com poder de magnificação de até 40x e resolução de 0.25 μm por *pixel* (Figuras 15-17).

O Philips Ultra Fast Scanner® é um scanner de autofocus, isto é, mantém a focalização enquanto realiza a varredura nas lâminas, não precisando de nenhuma intervenção humana neste processo, economizando tempo. O escaneamento e a focalização são realizados simultaneamente, e cada lâmina é escaneada com equivalência de resolução a uma imagem de magnificação de 40x. É um *scanner*

designado para altos volumes de escaneamento, possuindo 300 locais predestinados para lâminas, podendo trabalhar ininterruptamente durante longos períodos, incluindo à noite. Possui um modo de escaneamento que permite o acesso às lâminas e sua manipulação, sem prejudicar ou interromper o escaneamento das demais.

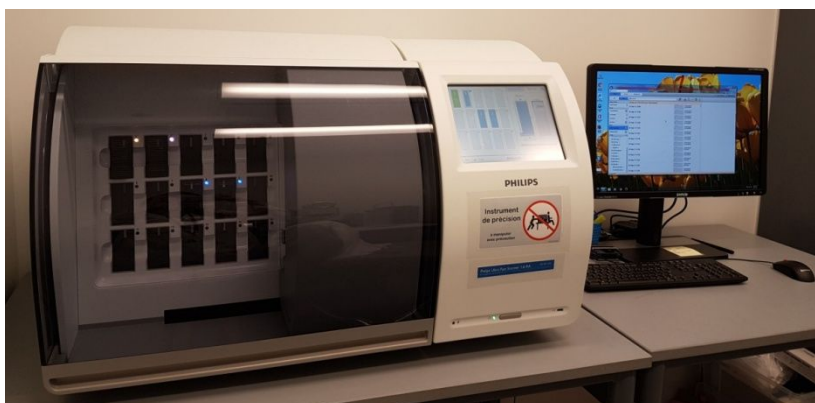


Figura 15. Scanner para digitalização de lâminas Philips Ultra Fast Scanner®.

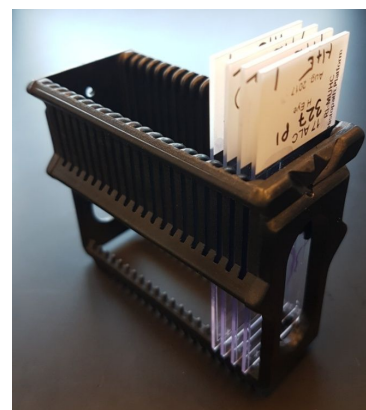


Figura 16. Cassete utilizado para inserção das lâminas no scanner.

Seu sistema operacional inicial foi desenhado para ser intuitivo em apenas dois passos “carregar e escanear”, iniciando o escaneamento assim que algum suporte para lâmina é preenchido e a porta do *scanner* é fechada. O escaneamento é executado sem qualquer interação do usuário, e o *scanner* é operado através de uma tela sensível ao toque e um computador adicional. Veja a Tabela 1 para especificações mais detalhadas do Philips Ultra Fast Scanner®.

Tabela 1. Especificações técnicas do Philips Ultra Fast Scanner®, de acordo com o fabricante.

Capacidade de lâminas	300 lâminas (15 suportes para cassetes, cada cassete com capacidade para 20 lâminas)
Tempo total de manipulação e captura de imagem por lâmina	60 segundos em magnificação equivalente a 40x (15 x 15 mm de área escaneada)
Método de escaneamento	Linear
Microscópio objetivo	Olympus, NA 0.75 Plan Apo
Método de focalização	Contínuo e autofocus
Tamanho de <i>pixel</i> / resolução	0.25 μm / <i>pixel</i>
Temperatura de operação	10 a 35 °C (para desempenho adequado)
Umidade relativa (sem condensador)	20 – 80% (para desempenho adequado)
Dimensões do <i>scanner</i>	656 x 933 x 587 mm (comprimento x largura x altura)
Peso	137 quilogramas (Kg)

Tão logo tenham sido escaneadas, as lâminas foram cuidadosamente revisadas e classificadas em 3 diferentes pastas (córneas normais, córneas

provenientes de falência de enxerto após rejeição e córneas cuja estruturação tecidual não estava adequada após a preparação histológica) (Figura 17).

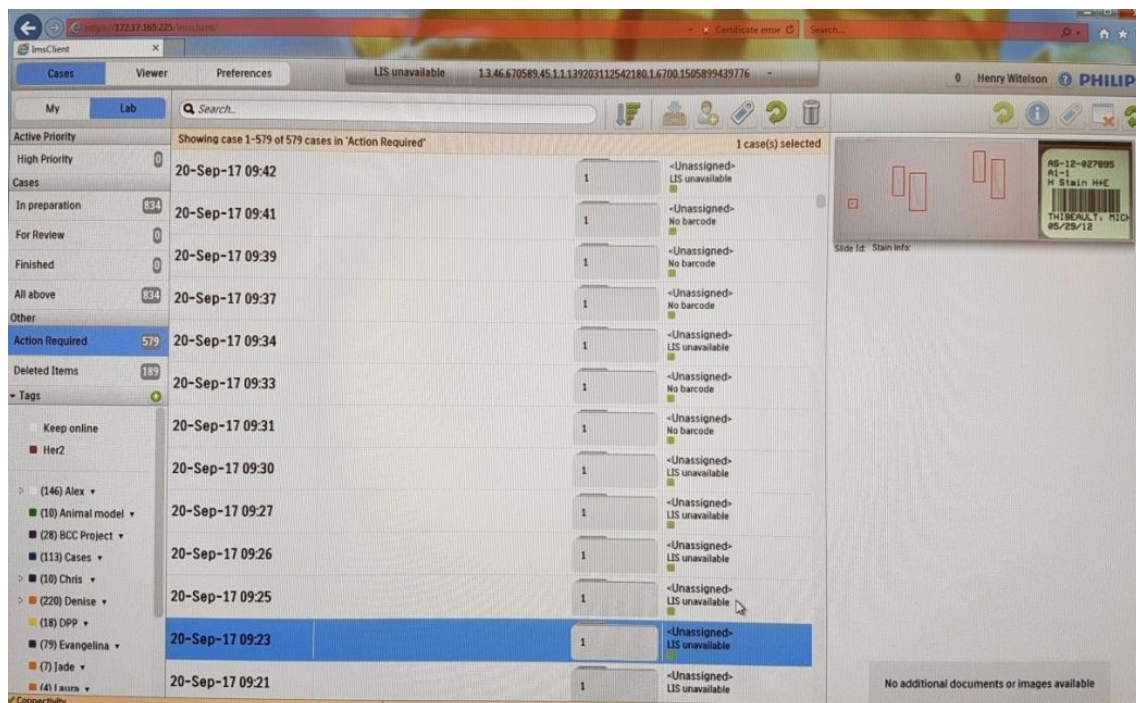


Figura 17. Interface do usuário no sistema operacional/software do Philips Ultra Fast Scanner®.

4.4.3 Aferição das medidas das camadas corneanas

As medidas das camadas corneanas foram realizadas utilizando a ferramenta “régua” do software *IntelliSite Pathology Solution*® integrante do scanner, inserida em uma barra de rolagem à esquerda do usuário (Figura 18). Para tal medição foi traçada uma linha paralela ao plano de fixação do tecido corneano na lâmina e outra linha perpendicular – ângulo exato de 90 graus (°), no aumento de 1x, servindo como referência para todas as marcações (Figura 19).

A região central foi estipulada como a localizada geograficamente no centro da amostra, e as regiões periféricas consideradas a 2,5 mm a partir da determinação do ponto central, em direção às laterais da amostra. As regiões periféricas foram determinadas em razão do tamanho dos botões corneanos, cujo menor diâmetro era de 6 mm.

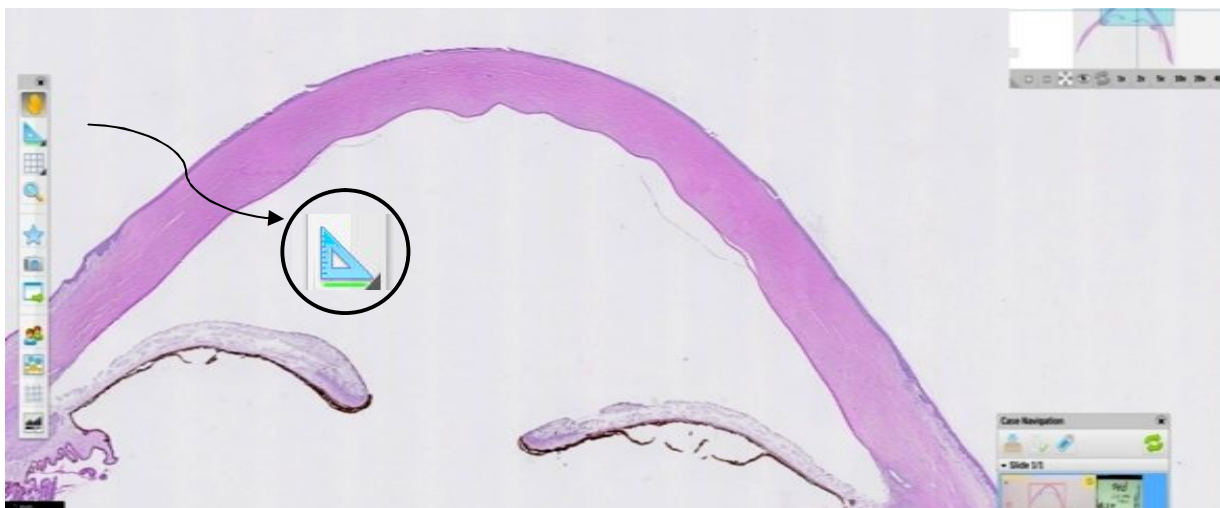


Figura 18. Destaque para ferramenta utilizada nas aferições e medidas da imagem de uma lâmina.

Durante a preparação dos espécimes corneanos, as regiões periféricas (nasal e temporal) foram previamente marcadas nas cores vermelho e azul, respectivamente, para servirem como referencial.

A unidade de medida foi automaticamente calculada pela régua, em milímetros (mm) nos aumentos de 10x e 20x ou micra (μm), no aumento de 40x.

Foram anotadas duas medidas equidistantes na periferia nasal do tecido, duas medidas equidistantes na periferia temporal, e duas medidas na região central do tecido, para cada lâmina, das camadas epitelial, estromal e MD (Figura 19).

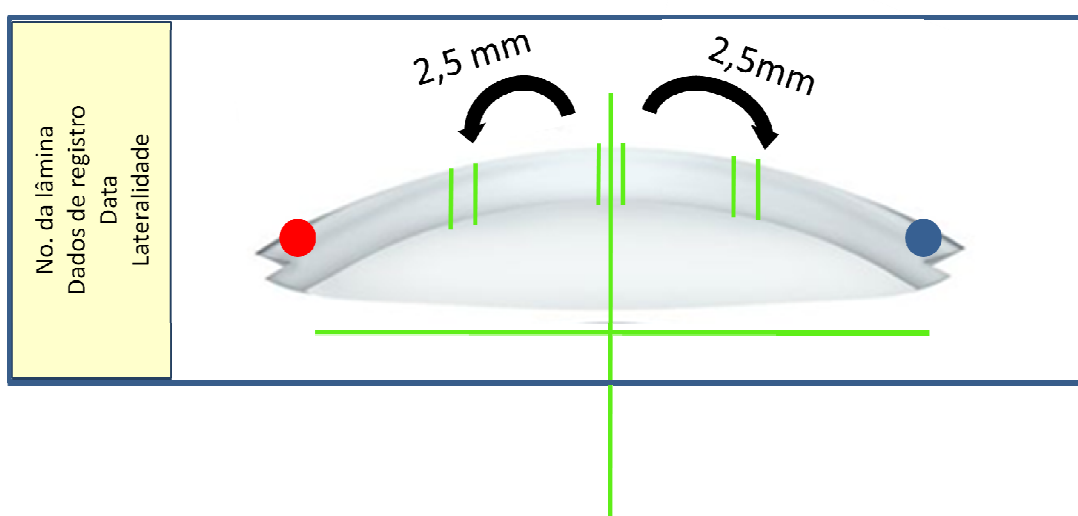


Figura 19. Desenho esquemático dos referenciais utilizados para aferição das medidas corneanas utilizando *software* de microscopia digital.

As dimensões do epitélio e da MD foram determinadas através do aumento de 40x do *software* (Figuras 20 e 21), enquanto que as dimensões do estroma e da espessura total corneana foram estipuladas inicialmente com aumento de 10x, sendo posteriormente ajustadas utilizando aumento de 20x e, por fim, 40x. Cabe lembrar que a magnificação não mudou o tamanho da medida, apenas facilitou a aferição.

Cabe destacar que no *software* a localização das estruturas ainda não se dá de modo automático, sendo o usuário o responsável pela identificação das áreas em estudo.

Nas aferições através de microscopia óptica exclusivamente manual foi utilizado o microscópio Olympus EX41[®] (Olympus Corporation; Shenzhen, Guangdong/Japão), com magnificações de até 40x (Figura 22).

Medidas clínicas das córneas normais e de enxertos apresentando falência por rejeição não foram possíveis de ser obtidas, tendo esta pesquisa se restringido às aferições de espécimes *ex vivo* através de medições histológicas. Aferições utilizando HR-OCT foram tentadas, porém este equipamento não oferece distinção visual entre o endotélio e MD, comprometendo as análises.

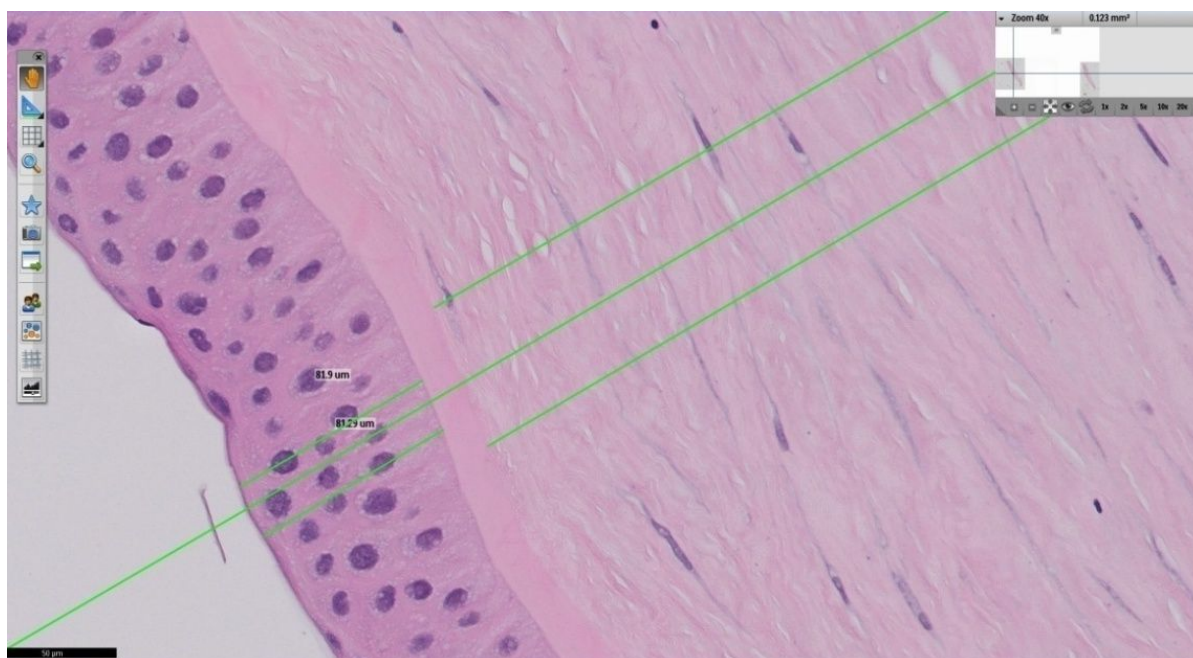


Figura 20. Detalhes da técnica de aferição das medidas do epitélio corneano em lâmina corada com HE, magnificação 40x.

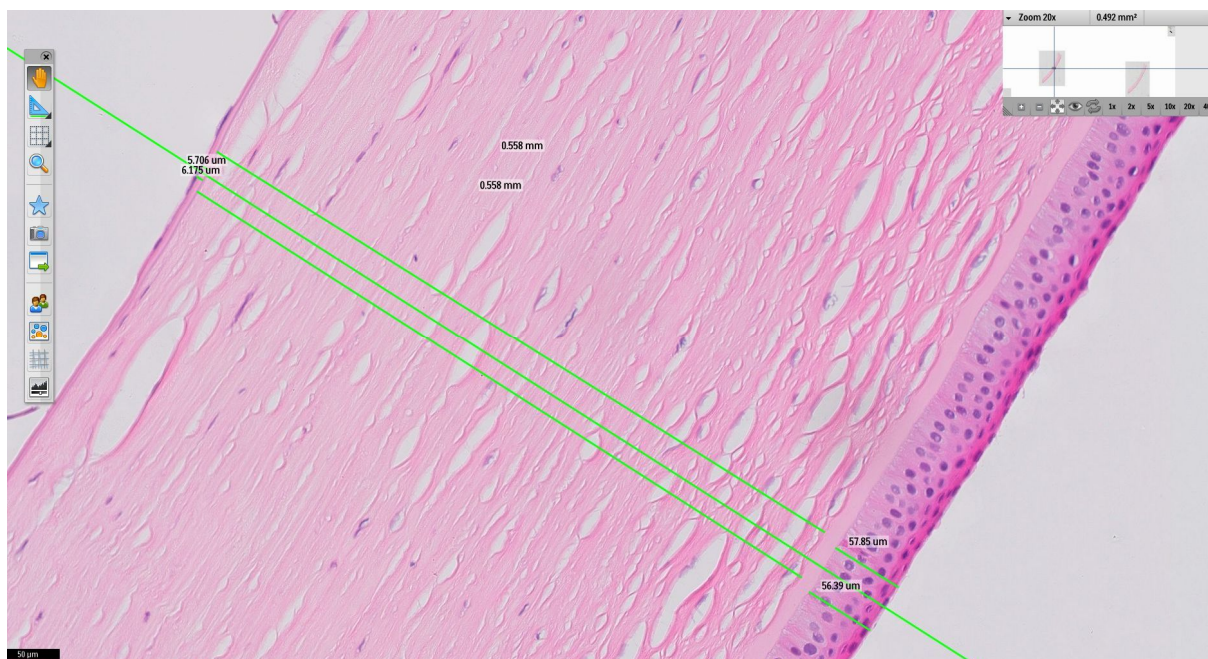


Figura 21. Demonstração das aferições nas amostras corneanas, coloração HE, magnificação 20x.



Figura 22. Microscópio óptico marca Olympus EX41[®] utilizado para microscopia exclusivamente manual.

4.4.4 Comparação das aferições exclusivamente manual e através da microscopia digital

A fim de realizar validação interna do estudo, foram coletadas medidas de espessura de 10 lâminas provenientes de enxertos rejeitados/falidos e 10 lâminas de córneas normais, previamente coradas com PAS, e realizadas comparações entre

os valores obtidos com método exclusivamente manual *versus* método de microscopia digital.

A coloração com PAS é vital para adequada medição de estruturas na microscopia óptica, em especial a MD, sendo seu emprego facultativo na microscopia digital.

Foram arroladas inicialmente 10 lâminas de cada grupo, escolhidas de forma aleatória, para realização desta validação interna. Caso as medidas obtidas não tivessem poder estatístico, a amostra seria aumentada gradativamente.

Como referencial inicial das medições se adotou a região central corneana, tendo sido feita marcação especial com caneta tinteiro na interface do epitélio na região central para servir como guia. A ordem de aferição deveria ser a seguinte: primeira medida da espessura corneana total, após do epitélio, seguindo-se à medida da MD.

Todas as medidas foram realizadas por 2 médicos previamente treinados com experiência em patologia ocular, sendo um oftalmologista habituado com microscopia digital (TT) e o outro patologista habituado com microscopia óptica (MB).

4.5 Compilação dos dados

As seguintes informações foram coletadas de córneas normais e de enxertos apresentando falência por rejeição: número de registro da lâmina, idade, gênero, lateralidade, doença ocular prévia conforme descrição do prontuário médico, medidas da espessura obtidas de forma digital da região central, nasal e temporal (2 aferições em μm ou mm de cada região) referentes ao epitélio, estroma e MD. Ainda, das córneas provenientes de enxertos falidos por rejeição foram obtidas informações a respeito do número de transplantes prévios, tempo de sobrevivência do transplante e números de episódios de rejeição prévia.

Cabe destacar que não obtivemos acesso a idade do doador da córnea estudada como falida por rejeição.

Medidas da espessura da córnea total, epitélio e MD da região central de córneas coradas com PAS foram obtidas de forma exclusivamente manual com microscópio óptico convencional e digital (utilizando *scanner* e computador) e

tabeladas. Esta etapa foi realizada para validação interna do uso da microscopia digital.

As informações coletadas foram compiladas em tabelas do programa Microsoft Office Excel® (Microsoft Corporation; Redmond, Washington/EUA).

4.6 Análise estatística

O programa IBM *Statistics Base* SPSS 22.0® (SPSS Inc.; Chicago, Illinois/EUA) foi utilizado para análises descritivas e comparativas. Comparações de duas variáveis independentes foram realizadas usando teste t de Student para variáveis contínuas e teste Qui-quadrado para variáveis categóricas. Para comparações múltiplas, utilizou-se ANOVA e teste Tukey. O teste de Levene foi considerado para analisar homogeneidade e o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a igualdade de distribuição de probabilidade. Uma diferença foi considerada estatisticamente significativa com um valor de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 25 córneas normais *post-mortem* e 75 córneas provenientes de enxertos apresentando falência por rejeição. Por não apresentarem configuração anatômica adequada para este estudo foram excluídas da pesquisa 35 córneas de enxertos apresentando falência por rejeição, restando para análise 40 córneas neste grupo.

Das 25 córneas normais, 20 eram provenientes de pacientes do gênero feminino e 5 do masculino; das 40 córneas que apresentavam falência por rejeição, 20 eram de pacientes do gênero feminino e 20 do masculino.

Levando em consideração a amostragem das córneas normais, foram realizadas, conforme anteriormente mencionado, 2 medições na região central do epitélio, estroma e DM, totalizando 50 medições na região central de cada uma das camadas; 2 medições na região nasal do epitélio, estroma e DM de cada uma das 25 córneas, também totalizando 50 medições nesta região em cada camada corneana e 2 na região temporal do epitélio, do estroma e DM, originando 50 medições em cada camada corneana nesta região. Ao total 450 medições foram feitas nas córneas normais.

Nas 40 córneas provenientes de enxertos rejeitados foi aplicado o mesmo protocolo de aferição, obtendo-se ao total 80 medições na região central do epitélio, 80 medições na região central do estroma e 80 medições na região central da DM; na região nasal foram obtidas 80 medições do epitélio, 80 do estroma e 80 da DM; na região temporal 80 medições do epitélio, 80 do estroma e 80 da DM, somando 720 medidas provenientes destas córneas.

É importante destacar que ao serem aplicados os testes estatísticos a normalidade não foi rejeitada, assim a amostragem tornou-se confiável para estudo.

Nos pacientes cujas córneas eram oriundas de enxertos apresentando falência por rejeição, observou-se que a duração média destes enxertos variou de 55 dias a 18 anos (com mediana de 2 anos). Ainda, os prontuário médicos destes pacientes apresentavam outros diagnósticos oculares listados: 10 casos de ceratopatia bolhosa do pseudofácico; 11 pacientes apresentavam opacidades corneanas diversas; 1 apresentava distrofia corneana (não especificada); 1 uveíte; 6 pacientes com ceratocone; 6 pacientes distrofia de Fuchs; 3 pacientes com histórico de herpes corneano; 1 com síndrome de Cogan e 1 com síndrome irido-corneana.

Dos pacientes em questão, 27 apresentavam 1 transplante penetrante prévio; 6 pacientes apresentavam 1 transplante lamelar endotelial automatizado prévio; 1 possuía 2 transplantes penetrantes prévios; 2 pacientes apresentavam histórico de terem sido submetidos a 1 transplante penetrante e a 1 transplante lamelar endotelial automatizado; 2 pacientes possuíam antecedentes de 3 transplantes penetrantes e 2 pacientes haviam sido submetidos previamente a 3 transplantes (1 penetrante e 2 lamelares endoteliais automatizados). Os pacientes que realizaram transplantes endoteliais prévios não apresentavam diferenças estatísticas com relação às medidas das camadas corneanas quando comparados aos demais pacientes.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das variáveis descritivas analisadas (média da idade e lateralidade da retirada do tecido), média das aferições de espessuras corneanas das regiões central, nasal e temporal do epitélio, estroma e MD das córneas normais e das córneas provenientes de enxertos apresentando falência por rejeição. Cabe destacar que todas as medidas de espessura descritas nesta tabela foram obtidas através do *software* de microscopia digital.

A idade (média \pm desvio padrão) dos pacientes cujas córneas provenientes eram normais foi de 81,8 \pm 6,0 (variação de 71-95) anos e dos pacientes cujas córneas analisadas eram enxertos falidos por rejeição foi de 66,2 \pm 14,6 (variação de 31-88) anos, havendo diferença significativa entre os grupos ($p<0,001$).

Com relação às medidas de espessura, houve diferença entre os grupos normais e enxertos apresentando falência por rejeição na medida central do epitélio ($p<0,001$), nas regiões nasal estromal ($p<0,001$) e temporal estromal ($p<0,001$) e na MD nas regiões nasal ($p<0,001$) e temporal ($p<0,001$).

A Tabela 3 sumariza a comparação entre a média da espessura das diferentes regiões (central, nasal e temporal) da MD entre um mesmo grupo analisado (córneas normais x córneas de enxertos falidos) através de microscopia digital. Nas córneas normais a região central da MD apresenta média de espessura mais fina em relação às regiões periféricas ($p<0,001$), fato que não se observa nas amostras de enxertos apresentando falência por rejeição.

Tabela 2. Comparação da idade, lateralidade e medidas das camadas obtidas por microscopia digital entre córneas normais e córneas de enxertos apresentando falência por rejeição.

	Córneas normais (n=25)	Córneas de enxertos apresentando falência por rejeição (n=40)	Valor de p
Idade (anos; média±DP)	81,8 (±6,0)	66,2 (±14,6)	<0,001
Lateralidade			
Direito [%]	13 [52,0%]	20 [50,0%]	0,875
Esquerdo [%]	12 [48,0%]	20 [50,0%]	
Média das espessuras corneanas			
Epitélio (µm, 40x)			
Central (média±DP)	32,207 (±7,165)	47,683 (±15,518)	<0,001
Nasal (média±DP)	44,091 (±7,832)	48,228 (±21,514)	0,360
Temporal (média±DP)	43,228 (±10,802)	48,918 (±20,797)	0,211
Estroma (mm, 10x)			
Central (média±DP)	0,616 (±0,075)	0,561 (±0,163)	0,831
Nasal (média±DP)	0,911 (±0,119)	0,588 (±0,175)	<0,001
Temporal (média±DP)	0,964 (±0,143)	0,607 (±0,162)	<0,001
Membrana de Descemet (µm, 40x)			
Central (média±DP)	8,410 (±2,016)	8,545 (±2,712)	0,820
Nasal (média±DP)	14,363 (±4,885)	9,883 (±3,186)	<0,001
Temporal (média±DP)	13,337 (±3,184)	9,506 (±2,625)	<0,001

n=Número de casos

DP=Desvio padrão

mm=Milímetros

µm=Micra

10x, 40x=Medida do aumento microscópico

Foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov para testar igualdade de distribuição de probabilidade, para comparações de duas variáveis independentes teste t de Student em variáveis contínuas e teste Qui-quadrado para variáveis categóricas. O teste de Levene foi considerado para analisar homogeneidade.

Tabela 3. Comparação das médias das espessuras da membrana de Descemet obtidas por microscopia digital nas diferentes regiões de córneas normais e córneas de enxertos apresentando falência por rejeição.

	Média da espessura da membrana de Descemet (µm, 40x)			Valor de p
	Central	Nasal	Temporal	
Córneas normais (média±DP) [n=25]	8,410 ^a (±2,016)	14,363 ^b (±4,885)	13,337 ^b (±3,484)	<0,001
Córneas de enxertos apresentando falência por rejeição (média±DP) [n=40]	8,545 ^a (±2,712)	9,883 ^a (±3,186)	9,506 ^a (±2,625)	0,101

n =Número de casos

DP=Desvio padrão

µm=Micra

40x=Medida do aumento microscópico

^{a,b}=As letras identificam as diferenças entre os grupos para as medidas central, nasal e temporal de córneas normais e córneas provenientes de enxertos apresentando falência por rejeição.

Foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov para testar igualdade de distribuição de probabilidade, ANOVA e teste Tukey para comparação entre variáveis múltiplas das amostras.

Nas Tabelas 4 e 5 estão descritos os resultados obtidos de medidas de córneas normais e botões corneanos em falência, comparando-os através de

microscopia exclusivamente manual e microscopia digital. Para estas medidas foram utilizadas lâminas coradas com PAS, e selecionados aleatoriamente 10 casos de córneas normais e 10 casos de enxertos apresentando falência por rejeição.

Não houve diferença estatística entre as medidas obtidas com microscopia digital e as obtidas exclusivamente através de microscopia manual, quando realizadas as comparações entre os dois métodos de aferição.

Além do banco de dados, foi criado um banco de imagens corneanas utilizando o *software* de microscopia digital. A Figura 23 é uma demonstração da utilização da tecnologia de *scaneamento* de lâminas microscópicas e a exatidão desta ferramenta de análise.

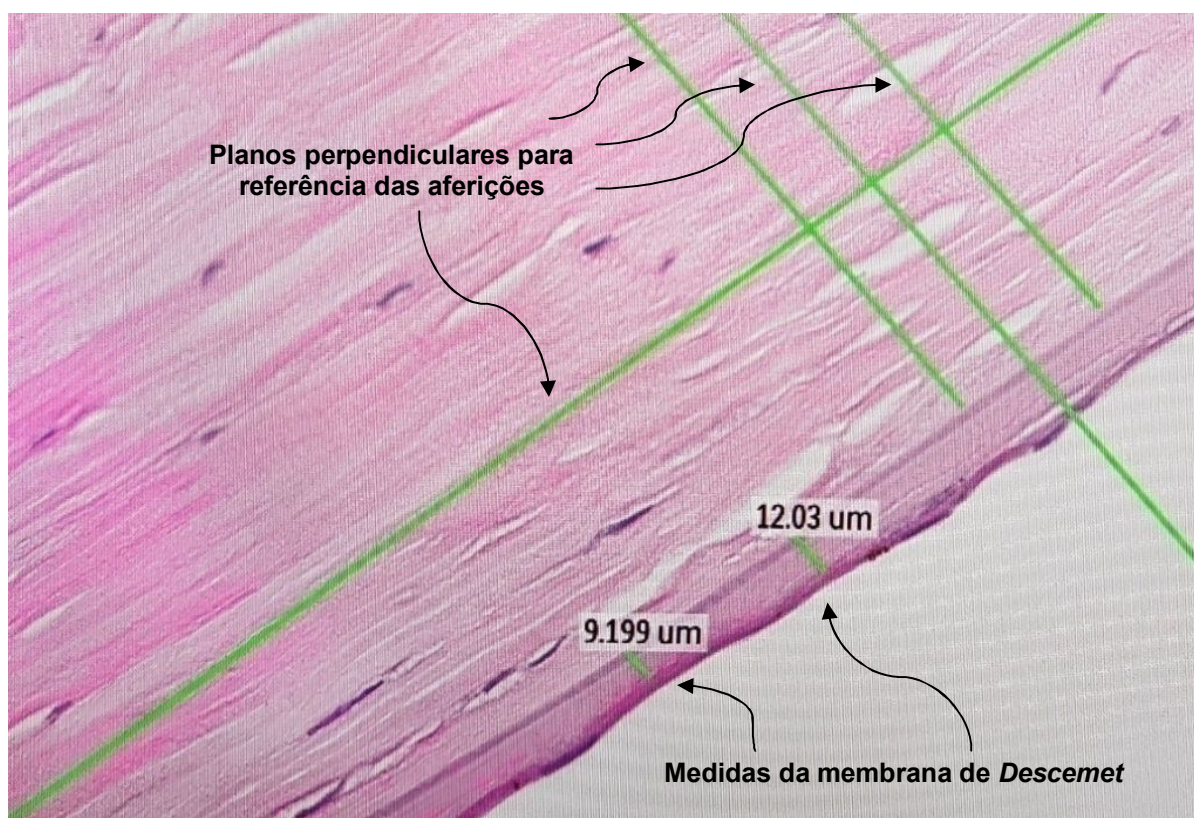


Figura 23. Medidas da membrana de Descemet em lâmina corada com HE, ênfase na exatidão da ferramenta utilizada, aumento 40x. As setas indicam as linhas perpendiculares utilizadas para referência nas medições e as medidas da membrana de Descemet.

Tabela 4. Comparação entre as medidas corneanas obtidas de microscopia exclusivamente manual e digital em 10 córneas normais, lâminas coradas com ácido periódico de Schiff (PAS).

Medidas corneanas	Microscopia manual	Microscopia digital	% da diferença
CASO 1			
Córnea total (mm, 10x)	0,56	0,56	0,00
Epitélio (μm , 40x)	23,00	22,91	-0,39
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	7,50	7,50	0,00
CASO 2			
Córnea total (mm, 10x)	0,57	0,57	0,00
Epitélio (μm , 40x)	38,75	38,78	+0,08
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	5,27	5,27	0,00
CASO 3			
Córnea total (mm, 10x)	0,59	0,59	0,00
Epitélio (μm , 40x)	48,50	48,49	-0,02
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	10,00	10,04	+0,40
CASO 4			
Córnea total (mm, 10x)	0,69	0,69	0,00
Epitélio (μm , 40x)	32,25	32,25	0,00
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	9,25	9,25	0,00
CASO 5			
Córnea total (mm, 10x)	0,68	0,68	0,00
Epitélio (μm , 40x)	36,30	36,31	+0,03
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	10,20	10,21	+0,10
CASO 6			
Córnea total (mm, 10x)	0,66	0,66	0,00
Epitélio (μm , 40x)	41,80	41,86	+0,14
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	8,30	8,31	+0,12
CASO 7			
Córnea total (mm, 10x)	0,52	0,52	0,00
Epitélio (μm , 40x)	41,40	41,44	+0,10
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	5,60	5,61	+0,18
CASO 8			
Córnea total (mm, 10x)	0,56	0,56	0,00
Epitélio (μm , 40x)	38,60	38,59	-0,03
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	7,61	7,61	0,00
CASO 9			
Córnea total (mm, 10x)	0,62	0,62	0,00
Epitélio (μm , 40x)	35,33	35,34	+0,03
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	7,26	7,26	0,00
CASO 10			
Córnea total (mm, 10x)	0,70	0,70	0,00
Epitélio (μm , 40x)	30,01	30,03	+0,07
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	9,58	9,58	0,00
MÉDIA DOS 10 CASOS			Valor de p
Córnea total (mm, 10x; média \pm DP)	0,615 (\pm 0,064)	0,619 (\pm 0,064)	0,885
Epitélio (μm , 40x; média \pm DP)	37,295 (\pm 5,802)	36,600 (\pm 7,090)	0,813
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x; média \pm DP)	8,265 (\pm 1,786)	8,066 (\pm 1,737)	0,804

mm=Milímetros

μm =Micra

10x, 40x=Medida do aumento microscópico

DP=Desvio padrão

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar igualdade de distribuição de probabilidade e para comparações de duas variáveis independentes se utilizou teste t de Student para variáveis contínuas. O teste de Levene foi considerado para analisar homogeneidade.

Tabela 5. Comparação entre as medidas corneanas obtidas de microscopia exclusivamente manual e digital em 10 enxertos apresentando falência por rejeição, lâminas coradas com ácido periódico de Schiff (PAS).

Medidas corneanas	Microscopia manual	Microscopia digital	% da diferença
CASO 1			
Córnea total (mm, 10x)	0,52	0,52	0,00
Epitélio (μm , 40x)	5,50	5,51	+0,18
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	7,80	7,70	-1,28
CASO 2			
Córnea total (mm, 10x)	0,28	0,28	0,00
Epitélio (μm , 40x)	20,80	20,87	+0,34
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	4,00	4,07	+1,75
CASO 3			
Córnea total (mm, 10x)	0,37	0,37	0,00
Epitélio (μm , 40x)	24,60	24,62	+0,08
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	7,60	7,63	+0,39
CASO 4			
Córnea total (mm, 10x)	0,56	0,56	0,00
Epitélio (μm , 40x)	50,10	50,16	+0,12
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	10,60	10,61	+0,09
CASO 5			
Córnea total (mm, 10x)	0,61	0,61	0,00
Epitélio (μm , 40x)	37,70	37,66	-0,11
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	8,90	8,93	+0,34
CASO 6			
Córnea total (mm, 10x)	0,41	0,41	0,00
Epitélio (μm , 40x)	63,70	63,73	+0,05
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	4,00	4,03	+0,75
CASO 7			
Córnea total (mm, 10x)	0,91	0,91	0,00
Epitélio (μm , 40x)	52,40	52,40	0,00
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	7,90	7,90	0,00
CASO 8			
Córnea total (mm, 10x)	0,57	0,57	0,00
Epitélio (μm , 40x)	41,30	41,30	0,00
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	7,20	7,26	+0,83
CASO 9			
Córnea total (mm, 10x)	0,70	0,71	+1,43
Epitélio (μm , 40x)	52,85	52,91	+0,11
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	13,80	13,86	+0,43
CASO 10			
Córnea total (mm, 10x)	0,39	0,39	0,00
Epitélio (μm , 40x)	72,40	72,48	+0,11
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x)	4,00	4,07	+1,75
MÉDIA DOS 10 CASOS			Valor de p
Córnea total (mm, 10x; média \pm DP)	0,532 (\pm 0,184)	0,541 (\pm 0,185)	0,918
Epitélio (μm , 40x; média \pm DP)	42,140 (\pm 20,523)	42,164 (\pm 20,532)	0,998
Membrana de <i>Descemet</i> (μm , 40x; média \pm DP)	7,580 (\pm 3,132)	7,545 (\pm 3,129)	0,980

mm=Milímetros

μm =Micra

10x, 40x=Medida do aumento microscópico

DP=Desvio padrão

Foi utilizado os teste de Kolmogorov-Smirnov para testar igualdade de distribuição de probabilidade e para comparações de duas variáveis independentes se utilizou teste t de Student para variáveis contínuas. O teste de Levene foi considerado para analisar homogeneidade.

6 DISCUSSÃO

A escolha da MD como objeto de estudo desta pesquisa se embasa na hipótese de que ela funcionaria como sinalizadora de rejeição e sobrevida dos enxertos corneanos, encontrando sua fundamentação em estudos de outros órgãos, como fígado, rins e pulmões^(25, 27, 94). Há fortes evidências na literatura sobre transplantes de órgãos sólidos que dizem que a determinação do aumento da espessura da membrana basal dos enxertos alógenos em estudos de microscopia óptica e eletrônica pode ser utilizada para detectar rejeição^(16, 25-28, 95). E, a MD sempre foi tida como uma verdadeira membrana basal corneana⁽⁴²⁾.

Em transplantes renais, aferição de múltiplas camadas e espessamento da membrana basal dos capilares peritubulares dos enxertos é uma técnica conhecida para diagnóstico de rejeição renal crônica e um preditor da sobrevida deste enxerto^(16, 95). O espessamento da membrana basal dos ductos biliares em transplantes hepáticos e da membrana basal dos bronquíolos em transplantes pulmonares são também sinais diagnósticos de rejeição e preditores de sobrevida do enxerto^(27, 28). Para detectar estes sinais em transplantes renais, hepáticos e pulmonares são necessárias biópsias invasivas⁽¹⁶⁾.

Em contraste com estes órgãos, a córnea é um órgão transparente e avascular⁽¹⁶⁾. Valendo-se desta premissa, alguns autores objetivaram determinar a espessura da MD, a membrana basal da córnea como anteriormente mencionado, utilizando tomografia de coerência óptica de alta definição (HR-OCT)⁽¹⁶⁾.

Estes autores realizaram uma pesquisa com imagens *in vivo* utilizando HR-OCT de 96 córneas transplantadas (transplantes penetrantes e lamelares posteriores automatizados), 40 destas córneas tidas como enxertos saudáveis, 23 apresentando rejeição ativa e 9 consideradas falidas por processo imunológico, comparando-as com 43 controles de olhos normais. Eles verificaram a medida da espessura central corneana e compararam com a medida do complexo MD/endotélio, criando um índice. Estes pesquisadores defendem que a medida da espessura do complexo MD/endotélio, bem como o índice que propuseram na pesquisa, são indicadores mais precisos para a saúde do enxerto do que a espessura corneana total central⁽¹⁶⁾.

Os tomógrafos de coerência óptica, mesmo os de última tecnologia, ainda não possuem resolução suficiente para distinguir visualmente a MD do endotélio, o que

pode ser um fator de confusão nestes estudos *in vivo* envolvendo HR-OCT, pois podem, por exemplo, misturar imagens de edema endotelial com espessamento da MD.

Outra pesquisa argumenta que o aumento de espessura do complexo MD/endotélio se deve ao espessamento da MD, baseado em um estudo *ex vivo*, retrospectivo, histopatológico, envolvendo 54 córneas (31 provenientes de enxertos falidos por rejeição e 23 córneas controles advindas de pacientes com melanoma sem comprometimento do segmento anterior)⁽⁹⁴⁾. Neste estudo, foram realizadas medidas da espessura total da córnea na região central, da MD e do endotélio e de membranas retro-corneais quando presentes, utilizando microscopia óptica. Foi verificado que não houve diferença na espessura total das córneas entre os dois grupos na região central, mas houve na MD⁽⁹⁴⁾. A crítica a este estudo é que em todas as córneas normais controles o endotélio pode ser estudado, e nas amostras de tecidos falidos por rejeição não, pois havia se desprendido. Os autores relatam que não havia diferença de idade entre os grupos.

Segundo Abou Shousha et al., a MD se espessa com o passar dos anos⁽⁴⁹⁾. Todavia, o padrão de espessamento e os valores médios para cada faixa etária ainda não foram estudados de forma sistemática. Nas análises apresentadas na nossa pesquisa houve diferença de idade entre os grupos: no grupo das córneas de enxertos falidos por rejeição a média de idade dos pacientes era menor que a de pacientes com córneas normais. Contudo, não se teve acesso à idade do doador da córnea para enxerto no momento em que este ocorreu.

Diante disso, todos os estudos que investigaram a MD até o momento podem ter um viés de confusão relacionado à idade e à córnea doada: talvez o doador tivesse uma idade mais avançada, e naturalmente sua córnea seria mais espessada, ou o oposto. Soma-se a isto o fato de que não se sabe com exatidão se após o transplante a MD continua a se espessar como uma córnea normal com o avançar dos anos, se este processo se estabiliza ou se devido ao trauma cirúrgico (sem ter havido episódio de rejeição, apenas pela manipulação ou inflamação inerente ao procedimento) a MD se espessa de forma mais intensa.

O modelo de investigação ideal para estudar o comportamento da MD seria estudar o botão doador antes de transplantá-lo, documentando a espessura de sua MD, e acompanhá-lo ao longo de sua sobrevivência como enxerto, relatando eventuais

episódios de reações imunomediadas correlacionando-as com a espessura da MD e idade. O estudo das lamelas corneanas deveria ser através de instrumentos de não-contato e utilizando aparelhos com elevada acurácia tanto *in vivo* quanto *ex vivo*. Neste sentido, faz-se necessária melhoria na resolução dos aparelhos de imagens, como exemplo HR-OCT, para que sejamos capazes de estudar de forma isolada e detalhadamente todas as camadas corneanas, sem interferência humana ou de possíveis danos ao tecido em sua manipulação.

Estas hipóteses citadas anteriormente podem também justificar os resultados encontrados em análise das regiões da MD entre córneas normais e córneas de enxertos apresentando falência por rejeição: não houve diferença relevante entre as medidas da região central. A questão da idade do receptor e do doador da córnea podem justificar este achado, bem como injúrias no momento da cirurgia ou a própria reação de rejeição (que também consiste em uma injúria ao tecido). Certos pesquisadores defendem que a MD pode se espessar além do normal ao ser submetida a agressões^(16, 49).

Nossos achados diferem de trabalhos prévios que sugerem que o complexo MD/endotélio se espessa na região central em córneas em vigência de rejeição, e que este espessamento se deve à MD^(16, 94). Cabe ressaltar que um destes estudos não conseguiu separar a camada endotelial da MD em suas medições e o outro pode ter sido afetado por problemas durante a preparação histológica.

Na região periférica da MD houve diferença entre os grupos. Até o momento, não foi ainda estabelecido o comportamento fisiológico e patológico da MD. Pode ser que durante um processo de rejeição a periferia corneana não se espesse, mas se afine, devido às reações imunológicas que ali se iniciam. Talvez o ponto chave para o estudo das rejeições não seja olhar atentamente para a região central corneana, mas sim para a região periférica.

Ainda, a diferença encontrada nas medidas da região periférica pode ser consequência do método de aferição utilizado. É importante atentar, também, que os tecidos podem sofrer interferência no momento de preparação das amostras, estando sujeitos à blocagem de forma inclinada ou cortes não paralelos, situações estas capazes de produzirem artefatos na espessura. Nenhum estudo histopatológico está livre destes potenciais vieses, inclusive aqueles que utilizam aparelhos e fazem preparação dos tecidos de forma automatizada.

Outra possibilidade a se considerar é que a MD pode não se comportar como as demais membranas basais de órgãos vascularizados como rins, fígado e pulmões em vigência de um processo imunológico como a rejeição; uma vez que a fisiologia corneana difere bastante dos demais órgãos do corpo humano.

O estudo histopatológico talvez seja apenas o início de nossa jornada investigativa sobre a MD, uma vez que ele pode sofrer interferências na preparação do material, comprometendo o resultado final. Soma-se a isto a concepção de que o diagnóstico histopatológico é um diagnóstico mais tardio, no qual as injúrias já ocorreram ao tecido e em sua maioria são irreversíveis.

Como previamente descrito, o manejo dos tecidos durante o ato cirúrgico, a fixação em formalina, o embebimento em parafina e os métodos de armazenamento são condições que impactam a qualidade do exemplar histológico⁽⁹⁶⁾, o que pode limitar o aperfeiçoamento dos estudos histopatológicos.

Idealmente, as amostras devem ser fixadas tão logo possível a fim de reduzir o tempo de isquemia e dano tecidual⁽⁹⁶⁾. O tempo de exposição à solução fixadora de formalina também é crítico para a preservação das amostras⁽⁹⁶⁾, bem como o tempo de armazenamento dos blocos e lâminas.

Há pesquisadores demonstrando que mesmo amostras fixadas em formalina e embebidas em blocos de parafina armazenados por mais de 30 anos podem produzir lâminas de qualidade⁽⁹⁷⁾. Ainda, os mesmos pesquisadores argumentam que em algumas lâminas as colorações por HE podem ser um pouco mais instáveis quando os blocos de parafina foram armazenados por longos períodos, sendo a causa disto incerta⁽⁹⁷⁾. Sabe-se que para a microscopia digital coloração é uma das etapas mais importantes do processo, portanto, lâminas advindas de blocos armazenados por longas datas podem ser um obstáculo ao uso de *scanners*.

As 3 maiores camadas da córnea – epitélio, estroma e endotélio – podem sofrer processo de rejeição^(2, 61). Reações imunológicas contra a camada de células endoteliais do doador é responsável pela maior parte dos casos de rejeição⁽⁹⁴⁾.

Contudo, artefatos durante a preparação histológica e fenômenos de alterações estruturais possuem menos chance de ocorrer com a MD, por isso a concentração de estudos *in vivo* e *ex vivo* nesta camada, e não no epitélio, no estroma ou no endotélio.

Apesar de terem sido realizadas medições nas regiões epitelial, estromal e de córnea total, estas medidas não foram consideradas para discussão. A razão disto é

que o epitélio pode perder partes de sua estruturação durante a retirada, fixação e preparação do tecido, sendo as medidas que dele se obtém não confiáveis. Este fenômeno também pode ocorrer com o endotélio. O mesmo processo de possível viés ocorre com o estroma, que sofre alteração de sua espessura durante a preparação histológica. Assim, tecidos corneanos que apresentam edema estromal não apresentam este edema nas lâminas histopatológicas, se devendo isto à remoção pela desidratação do álcool quando ocorre preparação das lâminas⁽⁹⁴⁾.

Cabe destacar que transplantes com pelo menos um episódio de rejeição tem em média três anos a menos de sobrevida com relação aos que nunca apresentaram nenhum⁽⁹⁴⁾. A chave para proteger os transplantes corneanos, neste sentido, é o precoce e acurado diagnóstico de rejeição, iniciando-se prontamente o tratamento, a fim de prevenir dano irreversível ao enxerto^(16, 98).

As técnicas diagnósticas disponíveis atualmente são falhas neste aspecto⁽¹⁶⁾. Há insuficiente sensibilidade e especificidade nos testes para detectar processos de rejeição leves e precoces, o que permitiria aos clínicos determinar acuradamente o *status* imunológico do enxerto e prever sua sobrevivência⁽¹⁶⁾.

Enquanto as ferramentas para estudo *in vivo* carecem de melhorias em seus sistemas de captação e processamento de imagens, a área de histopatologia está experimentando uma verdadeira revolução tecnológica com a utilização da microscopia digital.

Artigos publicados nos últimos anos defendem que a microscopia digital tem muitas vantagens para o ensino de histologia e patologia, incluindo o custo relativamente baixo de manutenção, a redução das barreiras econômicas relacionadas com os espaços físicos laboratoriais e tempo, e o aumento do acesso ao material de aprendizado^(73, 99-101).

Autores argumentam que *slides* virtuais podem prover uma flexibilidade sem precedentes ao estudo de histologia/patologia, permitindo aos usuários verem lâminas ou *slides* quase ao mesmo tempo, em qualquer momento e em qualquer lugar, produzir anotações para melhora do aprendizado, e integrar imagens a outros recursos digitais⁽⁷³⁾. Considerando todas estas vantagens, combinando-as com a universalidade do acesso à Internet, não é surpresa que muitas instituições educacionais estão adotando a microscopia digital no lugar da abordagem tradicional de histologia e patologia⁽⁷³⁾.

A despeito de todas estas vantagens bem-documentadas da microscopia digital, é importante destacar algumas limitações desta tecnologia: está intrinsecamente dependente de adequada funcionalidade dos computadores, *softwares*, unidades de armazenamento de dados, redes, servidores, e uma série de programas que possuem custos variados⁽⁷³⁾. Assim, devido a limitações nos sistemas de rede locais ou restrito acesso à Internet, a adoção de microscopia digital pode não ser custo-efetiva ou inatingível para alguns usuários⁽⁷³⁾.

A maioria dos *softwares* automaticamente seleciona a área a ser escaneada e evita escaneamento de áreas em branco (sem estruturas)⁽⁷²⁾. Isto pode, entretanto, causar problemas, especialmente se as lâminas forem fracamente coradas ou se tecidos como o gorduroso, não forem automaticamente reconhecidos⁽⁷²⁾.

O foco é outro ponto delicado a se destacar durante o processo de escaneamento⁽⁷²⁾. Atualmente, a maioria dos *scanners* de lâminas comerciais não possuem ajuste de foco dinâmico durante o processo de escaneamento. Ao invés, utilizam um número restrito de pontos de focalização na lâmina, o que frequentemente leva a uma perda de foco entre estas áreas⁽⁷²⁾. Além disso, áreas com focalização sub-ótimas no tecido como dobras teciduais, bolhas de ar, e incompleta cobertura pela lamínula influenciam fortemente o foco do tecido adjacente^(72, 102). Os *scanners* mais novos são capazes de realizar focalização de forma contínua durante o escaneamento, o que reduz problemas de foco, como o utilizado nesta pesquisa^(72, 91).

A qualidade das imagens digitais de *slides* depende de uma série de fatores, como a preparação dos tecidos, a qualidade óptica do *scanner* digital, o algoritmo que faz leitura da lâmina e seleciona determinada área para escaneamento e o mecanismo de autofocalização⁽⁹⁰⁾. Independentemente da escolha do equipamento de *scanner*, a qualidade do processo de preparação dos tecidos, como a espessura dos cortes, o posicionamento das estruturas nas lâminas de vidro e a coloração, parecem ter um impacto nos resultados de qualidade das imagens⁽⁹⁰⁾. Secções muito finas geralmente produzem imagens de melhor qualidade devido ao maior sucesso do processo de autofocalização⁽⁹⁰⁾. Posicionar as estruturas e tecidos centralmente nas lâminas de vidro pode evitar problemas de escaneamento incompleto nas margens do *slide*⁽⁹⁰⁾. Lâminas com problemas de coloração ou com áreas de coloração sobrepostas resultam em imagens cujas características são difíceis de distinguir⁽⁹⁰⁾.

Outra desvantagem da microscopia digital inclui uma potencial perda da estereopsia, condição que geralmente se encontra na microscopia óptica⁽⁷³⁾. A tridimensionalidade dos tecidos é intrinsecamente difícil de ser vista em virtude dos cortes produzidos com micrótomo serem bastante finos, e alguns *scanners* possuem apenas um plano de focalização da imagem⁽⁷³⁾.

Apesar das limitações, esta pesquisa foi pioneira a utilizar a microscopia digital para documentação e aferição das medidas das camadas corneanas, comparando amostras destes tecidos patológicos com tecidos normais. Ainda, é um dos poucos estudos a considerar as camadas MD e endotélio separadamente e o fator idade em sua discussão.

Novas pesquisas se fazem necessárias, principalmente em razão dos fatores de confundimento intrincados à idade e botões doados, e possíveis artefatos de preparação histológica. É necessário que outros estudos investiguem as camadas corneanas de pacientes de forma prospectiva, com melhores métodos de imagem, maior número de aferições e avaliadores, para que possamos estabelecer de forma padronizada o comportamento fisiológico e patológico da córnea, em especial da MD.

Nossas perspectivas são de que em um futuro próximo instrumentos capazes de detectar precocemente condições patológicas sejam desenvolvidos, ou que os atuais sejam aprimorados para tal finalidade. Equipamentos não-invasivos, que apenas com a imagem do local a ser estudado possibilitem uma visão a nível celular e cujos softwares possam ser aprimorados com inteligência artificial para auxílio diagnóstico. Para tanto, precisamos desvendar os mistérios da histologia, e compreender de forma definitiva como os tecidos se comportam tanto na homeostase quanto em condições adversas ou patológicas.

7 CONCLUSÕES

7.1 Córneas normais apresentaram medidas menores de espessura central epitelial quando comparadas ao grupo de enxertos com falência por rejeição. Ainda, nas córneas normais as espessuras do estroma e membrana de *Descemet* da periferia nasal e temporal eram maiores do que as medidas destas regiões do outro grupo estudado.

7.2 Quando efetuada comparação entre a média da espessura das diferentes regiões (central, nasal e temporal) da membrana de *Descemet* entre um mesmo grupo, nas córneas normais a região central da membrana de *Descemet* apresenta média de espessura mais fina em relação às duas regiões periféricas, diferença esta que não se verifica nos enxertos apresentando falência por rejeição.

8 REFERÊNCIAS

1. Crawford AZ, Patel DV, McGhee C. A brief history of corneal transplantation: From ancient to modern. *Oman J Ophthalmol*. 2013;6(Suppl 1):S12-7.
2. Panda A, Vanathi M, Kumar A, Dash Y, Priya S. Corneal graft rejection. *Survof Ophthalmol*. 2007;52(4):375-96.
3. The Australian Corneal Graft Registry. 1990 to 1992 report. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1993;21(2 Suppl):1-48.
4. Des Marchais B, Bazin R, Boisjoly HM, Laughrea PA, Dube I, Lille S, et al. Role of presensitization and donor-recipient crossmatching in corneal graft outcome. *Cornea*. 1998;17(2):141-5.
5. Maumenee AE. Clinical aspects of the corneal homograft reaction. *Invest Ophthalmol*. 1962;1:244-52.
6. Boisjoly HM, Tourigny R, Bazin R, Laughrea PA, Dube I, Chamberland G, et al. Risk factors of corneal graft failure. *Ophthalmology*. 1993;100(11):1728-35.
7. Hoffmann F, Pahlitzsch T. Predisposing factors in corneal graft rejection. *Cornea*. 1989;8(3):215-9.
8. Price MO, Thompson RW, Jr., Price FW, Jr. Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts. *Arch Ophthalmol*. 2003;121(8):1087-92.
9. Kostelna H, Rosocha J, Paulikova E, Kozak I, Antalova M, Mahel M, et al. Pathological findings in cornea tissue of patients with penetrating keratoplasty. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;48(2):267-72.
10. Nishida T. Commanding roles of keratocytes in health and disease. *Cornea*. 2010;29 Suppl 1:S3-6.
11. Hovakimyan M, Falke K, Stahnke T, Guthoff R, Witt M, Wree A, et al. Morphological analysis of quiescent and activated keratocytes: a review of ex vivo and in vivo findings. *Curr Eye Res*. 2014;39(12):1129-44.
12. Kocaba V, Colica C, Rabilloud M, Burillon C. Predicting Corneal Graft Rejection by Confocal Microscopy. *Cornea*. 2015;34 Suppl 10:S61-4.

13. Beauregard C, Huq SO, Barabino S, Zhang Q, Kazlauskas A, Dana MR. Keratocyte apoptosis and failure of corneal allografts. *Transplantation*. 2006;81(11):1577-82.
14. Liu YC, Lwin NC, Chan NS, Mehta JS. Use of anterior segment optical coherence tomography to predict corneal graft rejection in small animal models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(10):6736-41.
15. Shih CY, Ritterband DC, Palmiero PM, Seedor JA, Papachristou G, Harizman N, et al. The use of postoperative slit-lamp optical coherence tomography to predict primary failure in descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2009;147(5):796-800.
16. Abou Shousha M, Yoo SH, Sayed MS, Edelstein S, Council M, Shah RS, et al. In Vivo Characteristics of Corneal Endothelium/Descemet Membrane Complex for the Diagnosis of Corneal Graft Rejection. *Am J Ophthalmol*. 2017;178:27-37.
17. Lopez de la Fuente C, Sanchez-Cano A, Segura F, Hospital EO, Pinilla I. Evaluation of Total Corneal Thickness and Corneal Layers With Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *J Refract Surg*. 2016;32(1):27-32.
18. Abou Shousha M, Perez VL, Fraga Santini Canto AP, Vaddavalli PK, Sayyad FE, Cabot F, et al. The use of Bowman's layer vertical topographic thickness map in the diagnosis of keratoconus. *Ophthalmology*. 2014;121(5):988-93.
19. Alberto D, Garelo R. Corneal Sublayers Thickness Estimation Obtained by High-Resolution FD-OCT. *Int J Biomed Imaging*. 2013;2013:989624.
20. Brunye TT, Mercan E, Weaver DL, Elmore JG. Accuracy is in the eyes of the pathologist: The visual interpretive process and diagnostic accuracy with digital whole slide images. *J Biomed Inform*. 2017;66:171-9.
21. May M. A better lens on disease. *Sci Am*. 2010;302(5):74-7.
22. Krupinski EA, Tillack AA, Richter L, Henderson JT, Bhattacharyya AK, Scott KM, et al. Eye-movement study and human performance using telepathology virtual slides: implications for medical education and differences with experience. *Hum Pathol*. 2006;37(12):1543-56.

23. Ferreira R, Moon B, Humphries J, Sussman A, Saltz J, Miller R, et al. The Virtual Microscope. *Proc AMIA Annu Fall Symp.* 1997;449-53.
24. Weinstein RS. Innovations in medical imaging and virtual microscopy. *Hum Pathol.* 2005;36(4):317-9.
25. Aita K, Yamaguchi Y, Horita S, Ohno M, Tanabe K, Fuchinoue S, et al. Thickening of the peritubular capillary basement membrane is a useful diagnostic marker of chronic rejection in renal allografts. *Am J Transplant.* 2007;7(4):923-9.
26. Roufosse CA, Shore I, Moss J, Moran LB, Willicombe M, Galliford J, et al. Peritubular capillary basement membrane multilayering on electron microscopy: a useful marker of early chronic antibody-mediated damage. *Transplantation.* 2012;94(3):269-74.
27. Taddesse-Heath L, Kovi J. Electron microscopic findings in hepatic allograft rejection. *J Natl Med Assoc.* 1994;86(10):779-82.
28. Siddiqui MT, Garrity ER, Martinez R, Husain AN. Bronchiolar basement membrane changes associated with bronchiolitis obliterans in lung allografts: a retrospective study of serial transbronchial biopsies with immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 1996;9(3):320-8.
29. Basic and Clinical Science Course. External Diseases and Cornea American Academy of Ophthalmology; 2014-2015. p. 5-10.
30. Coster DJ. *Fundamentals of Clinical Ophthalmology – Cornea*: BMJ Books; 2002. 180 p.
31. Yamada N, Chikama TI, Morishige N, Yanai R, Nishida T, Inui M, et al. Homozygous mutation (L527R) of TGFBI in an individual with lattice corneal dystrophy. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(6):771-3.
32. Moffatt SL, Cartwright VA, Stumpf TH. Centennial review of corneal transplantation. *Clin Exp Ophthalmol.* 2005;33(6):642-57.
33. Maurice DM. In: Davson H, editor. *The Eye*. Orlando: Academic Press; 1984. p. 158.
34. Mishima S. Corneal thickness. *Surv Ophthalmol.* 1968;13(2):57-96.

35. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778-85.
36. Stock EL, Kurpakus MA, Sambol B, Jones JC. Adhesion complex formation after small keratectomy wounds in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33(2):304-13.
37. Takahashi M, Fujimoto T, Honda Y, Ogawa K. Distributional change of fodrin in the wound healing process of the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33(2):280-5.
38. Spencer WH. *Ophthalmic Pathology. Atlas and Textbook*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997.
39. Yanoff M, Duker JS, Augsburger JJ. *Ophthalmology*. 2nd ed: Mosby; 2003.
40. Otori T. Electrolyte content of the rabbit corneal stroma. *Exp Eye Res*. 1967;6(4):356-67.
41. Johann Friedrich Meckel AJLJ, Augustus Sidney Doane. *Manual of descriptive and pathological anatomy*. Dublin, Edinburg: Nin and Co., Carfrae and Son; 1838.
42. Bourne WM, Johnson DH, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. III. Fuchs' dystrophy. *Arch Ophthalmol*. 1982;100(12):1952-5.
43. In: Pavan-Langston D, editor. *Manual of Ocular Diagnosis and Therapy*. 5th ed: Lippincott, Williams & Wilkins; 2002.
44. Sevel D, Isaacs R. A re-evaluation of corneal development. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1988;86:178-207.
45. Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25(12):1402-15.
46. Weller JM, Schlotzer-Schrehardt U, Tourtas T, Kruse FE. Influence of Ultrastructural Corneal Graft Abnormalities on the Outcome of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2016;169:58-67.

47. Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol*. 1982;100(12):1942-7.
48. Jakus MA. Studies on the cornea. II. The fine structure of Descemet's membrane. *J Biophys Biochem Cytol*. 1956;2(4 Suppl):243-52.
49. Abou Shousha M, Perez VL, Wang J, Ide T, Jiao S, Chen Q, et al. Use of ultra-high-resolution optical coherence tomography to detect in vivo characteristics of Descemet's membrane in Fuchs' dystrophy. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1220-7.
50. Schlotzer-Schrehardt U, Bachmann BO, Tourtas T, Torricelli AA, Singh A, Gonzalez S, et al. Ultrastructure of the posterior corneal stroma. *Ophthalmology*. 2015;122(4):693-9.
51. Binder PS, Rock ME, Schmidt KC, Anderson JA. High-voltage electron microscopy of normal human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(8):2234-43.
52. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(8):2244-58.
53. Streeten BW, Qi Y, Klintworth GK, Eagle RC, Jr., Strauss JA, Bennett K. Immunolocalization of beta ig-h3 protein in 5q31-linked corneal dystrophies and normal corneas. *Arch Ophthalmol*. 1999;117(1):67-75.
54. Gordon SR. Fibronectin antibody labels corneal stromal collagen fibrils in situ along their length and circumference and demonstrates distinct staining along the cell and stromal interfaces of Descemet's membrane. *Curr Eye Res*. 2014;39(3):312-6.
55. Schlotzer-Schrehardt U, Bachmann BO, Laaser K, Cursiefen C, Kruse FE. Characterization of the cleavage plane in Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology*. 2011;118(10):1950-7.
56. Schlotzer-Schrehardt U, Bachmann BO, Tourtas T, Cursiefen C, Zenkel M, Rossler K, et al. Reproducibility of graft preparations in Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology*. 2013;120(9):1769-77.

57. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(3):779-82.
58. Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV, Mishler K, Edelhauser HF. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol Vis.* 2005;11:816-24.
59. Gebhardt BM, Shi W. Experimental corneal allograft rejection. *Immunol Res.* 2002;25(1):1-26.
60. Maumenee AE. The influence of donor-recipient sensitization on corneal grafts. *Am J Ophthalmol.* 1951;34(5 2):142-52.
61. Khodadoust AA, Silverstein AM. Transplantation and rejection of individual cell layers of the cornea. *Invest Ophthalmol.* 1969;8(2):180-95.
62. Shapiro MB MM, Krachmer JH. Rejection. In: B B, editor. *Corneal Surgery, Theory, Technique and Tissues.* 2nd ed. St Louis: CV Mosby Company; 1997. p. 254-68.
63. Alldredge OC, Krachmer JH. Clinical types of corneal transplant rejection. Their manifestations, frequency, preoperative correlates, and treatment. *Arch Ophthalmol.* 1981;99(4):599-604.
64. 1a Parte Técnicas Histológicas - Uma abordagem prática. DVD Lançado do VI Congresso Regional de Histotecnologia no dia 15 a 17 de Novembro 2012 Fiocruz JR.2012. Disponível em:
https://www.youtube.com/watch?v=55hm1o_JPUk
65. Técnicas Histológicas: Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais; [acessado em 25/09/2017]. Disponível em:
<http://depto.icb.ufmg.br/dmor/pad-morf/histologicabasica.htm>.
66. Grizzle WE. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem.* 2009;84(5):185-93.
67. Carson FL. *Histotechnology: a self-instructional text.* 2nd ed. Chicago: ASCP Press; 1997.

68. Robert Rosa RB GH, Thereza Kramer, Tatyana Milman, Nasreen Syed, Matthew Wilson, Jacob Peer, Robert Fante. Ophthalmic pathology and intra ocular tumors: American Academy of Ophthalmology; 2011-2012.
69. 2a Parte Técnicas Histológicas - Uma abordagem prática. DVD Lançado do VI Congresso Regional de Histotecnologia no dia 15 a 17 de Novembro 2012 Fiocruz JR.: Fiocruz / Sociedade Brasileira de Histotecnologia; 2012. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=CFPRaUaBg_Y
70. Lee WR. Ophthalmic Histopathology. 1st ed. Malaysia: Springer-Verlang London Ltda; 1993.
71. 3a Parte Técnicas Histológicas - Uma abordagem prática. DVD Lançado do VI Congresso Regional de Histotecnologia no dia 15 a 17 de Novembro Fiocruz JR.: Fiocruz / Sociedade Brasileira de Histotecnologia; 2012. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=6LbT93H_A5k
72. Bertram CA, Klopfeisch R. The Pathologist 2.0: An Update on Digital Pathology in Veterinary Medicine. Vet Pathol. 2017;54(5):756-66.
73. Lee LMJ, Goldman HM, Hortsch M. The virtual microscopy database-sharing digital microscope images for research and education. Anat Sci Educ. 2018.
74. Hamilton PW, van Diest PJ, Williams R, Gallagher AG. Do we see what we think we see? The complexities of morphological assessment. J Pathol. 2009;218(3):285-91.
75. Helle L, Nivala M, Kronqvist P, Ericsson KA, Lehtinen E. Do prior knowledge, personality and visual perceptual ability predict student performance in microscopic pathology? Med Educ. 2010;44(6):621-9.
76. Bloodgood RA, Ogilvie RW. Trends in histology laboratory teaching in United States medical schools. Anat Rect B New Anat. 2006;289(5):169-75.
77. Mello-Thoms C, Mello CA, Medvedeva O, Castine M, Legowski E, Gardner G, et al. Perceptual analysis of the reading of dermatopathology virtual slides by pathology residents. Arch Pathol Lab Med. 2012;136(5):551-62.
78. Crowley RS, Naus GJ, Stewart J, 3rd, Friedman CP. Development of visual diagnostic expertise in pathology -- an information-processing study. J Am Med Inform Assoc. 2003;10(1):39-51.

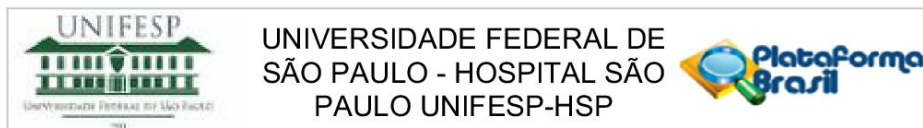
79. Virtual Microscopy and Virtual Slides in Teaching, Diagnosis, and Research. . 1st ed. Boca Raton, FL: GRG Press; 2005. 376 p.
80. Coleman R. Can histology and pathology be taught without microscopes? The advantages and disadvantages of virtual histology. *Acta Histochem.* 2009;111(1):1-4.
81. Dee FR. Virtual microscopy in pathology education. *Hum Pathol.* 2009;40(8):1112-21.
82. Drake RL, McBride JM, Pawlina W. An update on the status of anatomical sciences education in United States medical schools. *Anat Sci Educ.* 2014;7(4):321-5.
83. Hortsch M. Virtual biology: teaching histology in the age of Facebook. *FASEB J.* 2013;27(2):411-3.
84. Glatz-Krieger K, Glatz D, Mihatsch MJ. Virtual slides: high-quality demand, physical limitations, and affordability. *Hum Pathol.* 2003;34(10):968-74.
85. Goldberg HR, Dintzis R. The positive impact of team-based virtual microscopy on student learning in physiology and histology. *Adv Physiol Educ.* 2007;31(3):261-5.
86. Husmann PR, O'Loughlin VD, Braun MW. Quantitative and qualitative changes in teaching histology by means of virtual microscopy in an introductory course in human anatomy. *Anat Sci Educ.* 2009;2(5):218-26.
87. Wilson AB, Taylor MA, Klein BA, Sugrue MK, Whipple EC, Brokaw JJ. Meta-analysis and review of learner performance and preference: virtual versus optical microscopy. *Med Educ.* 2016;50(4):428-40.
88. Tiersma ES, Peters AA, Mooij HA, Fleuren GJ. Visualising scanning patterns of pathologists in the grading of cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol.* 2003;56(9):677-80.
89. Veremis B HM, Ramer N, Singh R. Digital Pathology: a Review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2017;124(3):e210.
90. Stathonikos N, Veta M, Huisman A, van Diest PJ. Going fully digital: Perspective of a Dutch academic pathology lab. *J Pathol Inform.* 2013;4:15.

91. Al-Janabi S, Huisman A, Van Diest PJ. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*. 2012;61(1):1-9.
92. Farahani N, Parwani AV, Pantanowitz L. Whole slide imaging in pathology: advantages, limitations, and emerging perspectives. *Pathol Lab Med Int*. 2015;7:23-33.
93. Indu M RR, Binu MP. "Slide less pathology": fairy tale or reality? *J Oral Maxillofac Pathol* 2016;20.
94. VanDenBerg R, Diakonis VF, Bozung A, Gameiro GR, Fischer O, El Dakkak A, et al. Descemet Membrane Thickening as a Sign for the Diagnosis of Corneal Graft Rejection: An Ex Vivo Study. *Cornea*. 2017.
95. Shimizu T, Ishida H, Shirakawa H, Omoto K, Tsunoyama K, Iida S, et al. Clinicopathological analysis of transplant glomerulopathy cases. *Clin Transplant*. 2009;23 Suppl 20:39-43.
96. Arreaza G, Qiu P, Pang L, Albright A, Hong LZ, Marton MJ, et al. Pre-Analytical Considerations for Successful Next-Generation Sequencing (NGS): Challenges and Opportunities for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue (FFPE) Samples. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9).
97. Ono Y, Sato H, Miyazaki T, Fujiki K, Kume E, Tanaka M. Quality assessment of long-term stored formalin-fixed paraffin embedded tissues for histopathological evaluation. *J Toxicol Pathol*. 2018;31(1):61-4.
98. Guilbert E, Bullet J, Sandali O, Basli E, Laroche L, Borderie VM. Long-term rejection incidence and reversibility after penetrating and lamellar keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2013;155(3):560-9.
99. Heidger PM, Jr., Dee F, Consoer D, Leaven T, Duncan J, Kreiter C. Integrated approach to teaching and testing in histology with real and virtual imaging. *Anat Rec*. 2002;269(2):107-12.
100. Krippendorf BB, Lough J. Complete and rapid switch from light microscopy to virtual microscopy for teaching medical histology. *Anat Rec B New Anat*. 2005;285(1):19-25.

101. Patel SG, Rosenbaum BP, Chark DW, Lambert HW. Design and implementation of a web-based, database-driven histology atlas: technology at work. *Anat Rec B New Anat.* 2006;289(5):176-83.
102. Pantanowitz L. Digital images and the future of digital pathology. *J Pathol Inform.* 2010;1.

Anexos

Anexo 1. Termo de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE IMAGENS DE CORTES HISTOPATOLÓGICOS E OBTIDAS ATRAVÉS DE TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA EM CÓRNEAS

Pesquisador: TAÍSE TOGNON

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57656116.0.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.642.065

Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n: 0921/2016

A anatomia corneana e as patologias relacionadas à córnea têm sido estudadas e descritas extensivamente na literatura. O diagnóstico e tratamento destas patologias estão sendo reformulados rotineiramente devido ao uso e aperfeiçoamento não somente dos biomicroscópios, mas devido ao emprego de análises histopatológicas e novos aparelhos para exame e confirmação. A recente introdução do tomógrafo de coerência óptica (OCT) tem provido aos oftalmologistas mais uma ferramenta precisa, que permite a análise de cortes microscópicos, auxiliando no diagnóstico de diversas patologias sem necessitar de outras intervenções ou de biópsias e análises histológicas (1). Neste sentido, o OCT tem se desenvolvido nas últimas décadas e se tornou um dos exames complementares diagnósticos mais importantes na prática oftalmológica (2). Esta tecnologia tem revolucionado nossa habilidade de examinar a câmara anterior, córnea e áreas adjacentes (3) e é aplicável uma enorme variedade de condições do segmento anterior, inclusive para documentação anatômica cirúrgica (3). As imagens provendo cortes seccionais transversais do OCT são similares ao ultrassom, contudo, sua maior resolução permite ao OCT medir e visualizar estruturas anatômicas muito pequenas e delicadas sem nenhum contato com o tecido (3). Assim, o OCT consegue documentar precisamente as estruturas até mesmo em córneas

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

opacas, permitindo exame detalhado da profundidade destas opacidades, mapas paquimétricos, bem como áreas de dissolução (melting) corneanas e esclerais, degenerações, cicatrizes e distrofias (3-5). A versatilidade, a acurácia e a alta resolução das imagens deste aparelho têm facilitado e melhorado o diagnóstico, o planejamento cirúrgico, as avaliações clínicas, o manejo do paciente e as decisões terapêuticas (3). Alguns autores defendem inclusive que eventualmente ele poderá englobar mais de uma ferramenta utilizada por outros aparelhos ou outras tecnologias (3). Entretanto, escassos estudos na literatura demonstram a correlação histológica e de imagens obtidas através do OCT, mais pesquisas são necessárias acerca da análise comparativa entre estas.

Objetivo da Pesquisa:

- Hipótese: É de comum consenso que documentação através de imagem é cada vez mais necessária em um mundo globalizado, não apenas como mero registro, mas para acompanhamento de patologias. Assim, atualmente inúmeros estudos têm se propagado considerando métodos novos de imagem para as estruturas oculares. A cada dia mais pesquisadores têm se aventurado no desenvolvimento de aparelhos de imagens cada vez mais rápidos, precisos para diagnósticos e indolentes aos pacientes. O tomógrafo de coerência óptica (OCT) tem despontado neste sentido. Nas últimas duas décadas a literatura científica oftalmológica experimentou crescimento exponencial de artigos sobre esta nova tecnologia diagnóstica. Contudo, poucos destes estudos levam em consideração os achados clínicos ao exame e correlação histopatológica de espécimes corneanos. Assim, estudos nesta área são mandatórios, uma vez que esta correlação ainda não foi bem esclarecida. Esta constitui a principal hipótese que norteia a pesquisa.

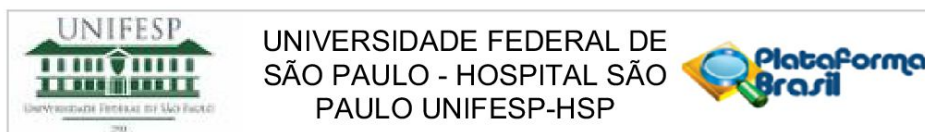
-Objetivo Primário: Descrever e realizar análise comparativa de imagens anatômicas obtidas através de tomografia de coerência óptica e cortes histopatológicos de córneas post-mortem provenientes de banco de olhos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara:

-Riscos: Tratando-se de um trabalho experimental, não haverá interferência no tratamento dos pacientes e o mesmo seguirá rigorosamente os preceitos que norteiam a Declaração de Helsinki, sendo submetido à aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP. Uma vez que estudo será realizado com olhos post-mortem advindos de bancos de olhos com histórico clínico dos pacientes, há o risco potencial de quebra de sigilo. Contudo, não haverá acesso a informações que

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14		
Bairro: VILA CLEMENTINO	CEP: 04.023-061	
UF: SP	Município: SAO PAULO	
Telefone: (11)5571-1062	Fax: (11)5539-7162	E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.642.065

identifiquem o paciente ou seus familiares e a equipe pesquisadora se comprometerá em utilizar os dados com absoluto resguardo de informações particulares e sigilosas, restringindo-se apenas ao objetivo da pesquisa.

-Benefícios: Descrição precisa sobre a correlação histopatológica e das imagens obtidas através de exame diagnóstico (tomografia de coerência óptica) de córneas humanas. Isso pode promover melhoria no software do aparelho e até futuramente a realização de biópsias "in vivo", sem a necessidade de cirurgias para estabelecimento de diagnósticos exatos, os quais seriam firmados somente com exame de imagem rápido e indolor

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com o objetivo acadêmico de Doutorado, vinculado ao Departamento de Oftalmologia, Campus Vila Clementino, com orientação do prof. Dr. Miguel Burnier Jr co-orientação dos Professores Drs. Luciene Barbosa de Sousa e Mauro Silveira de Queiroz Campos (professores orientadores da pós-graduação UNIFESP).

TIPO DE ESTUDO: Estudo experimental, prospectivo, transversal e analítico a ser realizado com olhos humanos post-mortem, provenientes do Banco de Olhos de Minessota/EUA e Banco de Olhos de San Diego/EUA, possuindo histórico oftalmológico completo. Os espécimes oculares fazem parte de projetos de pesquisa realizados entre a McGill University-Montreal/Canadá (Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory) e os respectivos bancos de olhos – vide carta em anexo.

PARTICIPANTES: olhos humanos post-mortem, provenientes do Banco de Olhos de Minessota/EUA e Banco de Olhos de San Diego/EUA. Cabe enfatizar que em nenhum momento da pesquisa serão utilizados olhos brasileiros ou qualquer material biológico proveniente do Brasil.

PROCEDIMENTOS:

Inicialmente os espécimes oculares post-mortem serão submetidos a exame de tomografia de coerência óptica (OCT), a fim de avaliar detalhadamente a estrutura corneana. A seguir, os mesmos espécimes em análise serão submetidos a exame histológico completo. Por fim, efetuar-se-á a análise comparativa entre as imagens de cortes histológicos e obtidas através de OCT nas córneas post-mortem. Após a finalização da análise e coleta dos dados, este material permanecerá no laboratório Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory para utilização em futuros estudos. Esta pesquisa faz parte de uma tese de doutorado do Departamento de Córnea e Doenças Externas Oculares e setor de Pós-Graduação em Oftalmologia da UNIFESP, a qual terá sua

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



Continuação do Parecer: 1.642.065

parte investigativa (análise dos olhos) realizada na McGill University-Montreal/Canadá (Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory), sob orientação do Professor Dr. Miguel N. Burnier Jr. (diretor do referido laboratório de patologia e professor orientador da pós-graduação UNIFESP) e sob co-orientação dos Professores Drs. Luciene Barbosa de Sousa e Mauro Silveira de Queiroz Campos (professores orientadores da pós-graduação UNIFESP). Tratando-se de um trabalho experimental, não haverá interferência no tratamento dos pacientes e o mesmo seguirá rigorosamente os preceitos que norteiam a Declaração de Helsinki, sendo submetido à aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP. A análise estatística será do tipo descritiva e comparativa, realizada por equipe treinada em programa específico – IBM SPSS22 (Statistical Package for Social Sciences - SPSS® Inc., Chicago, Illinois, USA) software. Após a finalização da análise e coleta dos dados, este material permanecerá no laboratório Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory (Montreal/Canadá) para utilização em futuros estudos. O laboratório em questão já possui convênio firmado com os bancos de olhos de Minnesota e San Diego/EUA, realizando inúmeros trabalhos de pesquisa desta natureza.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo;

2- outros documentos:

a)-autorização, por parte do Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory, para o uso das córneas obtidas em banco de olhos (Pasta: Declaração de Instituição e Infraestrutura-Submissão 1; Documento: EthicsLetterTaiseTognon.pdf)

3- Propõe dispensa do TCLE. Justificativa: Estudo realizado com espécimes post-mortem, através de convênio universitário com a McGill University-Montreal/Canadá (laboratório Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory) e secundariamente com outros bancos de olhos. Não será possível acesso ao prontuário dos doadores ou quaisquer dados que identifiquem a origem do tecido ou os familiares.

Recomendações:

Sem recomendações

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

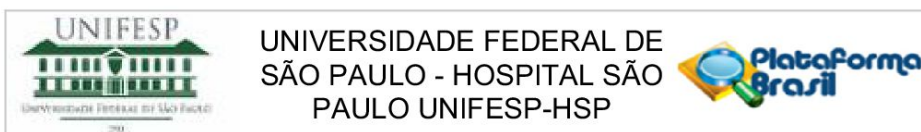
UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.642.065

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir da data de aprovação final, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_727976.pdf	06/07/2016 22:08:42		Aceito
Folha de Rosto	CEP.pdf	06/07/2016 22:07:41	TAÍSE TOGNON	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOTESEFINAL.pdf	06/07/2016 22:00:31	TAÍSE TOGNON	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	EthicsLetterTaiseTognon.pdf	13/06/2016 23:32:05	TAÍSE TOGNON	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Julho de 2016

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

Anexo 2. Termo de utilização dos espécimes oculares provenientes de bancos de olhos.



Centre universitaire
de santé McGill
Institut de recherche



McGill University
Health Centre
Research Institute

Miguel N. Burnier, Jr., MD, MSc, PhD, FRCS C
Professor of Ophthalmology, Pathology, Medicine, Oncology, Surgery
Director of Training & Development, MUHC-RI
Senior Ophthalmologist & Pathologist, MUHC & JGH

Director
Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory
1001 boul. Decarie, Block E, Lab# E02 B89, Montreal, QC H4A 3J1

Telephone: (514) 934-1934 ext. 76309
Email: miguel.burnier@mcgill.ca

June 13, 2016.

RE: Dr. Taise Tognon – Research Project - Ethics

To Whom It May Concern:

This letter is to inform you that Dr. Taise Tognon's research project entitled "Comparative analyses of corneal histopathologic sections and OCT images" will be dealing with eye bank eyes from both Minnesota Eye Bank and San Diego Eye Bank. The eye bank eyes will be obtained in accordance with all accepted guidelines from the respective eye banks. Please note that all research relating to this project will be done at the Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory, McGill University / MUHC / RI-MUHC in Montreal, Quebec, Canada.

Should you have any questions regarding this matter, please do not hesitate to contact me.

Best regards,

Miguel N. Burnier, Jr., MD, PhD, FRCSC
Director, Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory
Director, Training & Development, RI-MUHC

Bibliografia Consultada

Normas para teses e dissertações [Internet]. 2ª ed. rev. e corrigida. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Biblioteca Antônio Rubino de Azevedo, Coordenação de Cursos: 2015. Disponível em: <http://www.bibliotecacsp.unifesp.br/Documentos-Apostila/normas-para-teses-e-dissertações>.